

Institut für Biologie

Dissertation

**Charakterisierung von Autoantikörpern gegen
Protease-aktivierte Rezeptoren 1 und 2 und
gegen Endothelin-Rezeptor ET(A): Einfluss auf
die Funktion von Zellen des Herz-Kreislauf-
Systems**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
der Humboldt-Universität zu Berlin

von Jeannette Freier
geboren am 10.05.1978 in Frankfurt/Oder

Dekan: Prof. Dr. Christian Limberg

Gutachter: 1. Prof. Dr. Wolfgang Uckert
2. Prof. Dr. Thomas Harrer
3. Prof. Dr. Ingolf Schimke

eingereicht: 27.04.2007

Datum der Promotion: 13.12.2007

Abstract

Einige Patienten mit Raynaud-Syndrom, Urtikaria, koronarer Herzkrankheit, Angina pectoris, oder Pulmonaler Hypertonie haben funktionelle Autoantikörper gegen die Thrombin-Rezeptoren PAR1/2 und/oder gegen den Endothelin-Rezeptor ET(A). In dieser Arbeit wurde die Wirkung solcher Patienten-IgG-Präparate auf Funktionen von frisch isolierten, humanen Thrombozyten und Monozyten sowie von Ventrikel-Kardiomyozyten neonataler Ratten und von humanen, glatten Muskelzellen aus Coronararterien (hCASM) untersucht. Zum Vergleich wurden die PAR-Agonisten Thrombin und das stimulierende Peptid SFLLRN sowie Endothelin-1 verwendet. Die Ergebnisse der Thrombozytenaktivierung durch Patienten-IgG waren unterschiedlich. Versuche mit vorstimulierten Thrombozyten zeigten, dass ein stimulierender Einfluss der Autoantikörper auf präaktivierte Thrombozyten nicht ausgeschlossen werden kann. Ohne Vorstimulation jedoch schien Patienten-IgG eher einen hemmenden Einfluss auf die Thrombozytenfunktion zu haben. Eine Vorinkubation von Monozyten mit Patienten-IgG hatte keinen Einfluss auf die PMA-induzierte Produktion von Superoxidanion im Vergleich zu Kontroll-IgG. Nur bei zwei von fünf Patienten-IgGs konnte eine stimulierende Wirkung anhand der monozytären ERK1/2-Phosphorylierung gefunden werden. Während aufgereinigte ET(A)-Autoantikörper ERK1/2 in Kardiomyozyten nicht aktivierten, bewirkten IgG-Präparate mit PAR-Autoantikörpern hier eine ähnliche Aktivierung wie das Peptid SFLLRN. Überraschenderweise bewirkte Kontroll-IgG eine starke Aktivierung von ERK1/2. Die Coinkubation der Kardiomyozyten mit Antikörper-Präparaten und IL-1 β erhöhte die Phosphorylierung von ERK1/2 in allen Fällen. In hCASM bewirkten IgG-Präparate mit PAR-Autoantikörpern und Kontroll-IgGs eine Aktivierung von ERK1/2, ET(A)-Autoantikörper nicht. Die Schlussfolgerung aus dieser Arbeit liegt darin, dass PAR1/2- und ET(A)-Autoantikörper keine allgemeine Wirkung auf die Funktion von Thrombozyten, Monozyten und glatten Gefäßmuskelzellen zeigten. Die Unterscheidung von Autoantikörper-positiven und -negativen IgG-Präparaten war nur über die Bestimmung der Pulsationsrate von Kardiomyozyten möglich.

Autoantikörper
Thrombin
Endothelin-1
kardiovaskulär
PAR
ET(A)

Abstract

Some patients with Raynaud's syndrome, urticaria, coronary artery disease, Angina or pulmonary hypertension have functional autoantibodies against thrombin receptors PAR1/2 and/or against endothelin receptor ET(A). In this work the effects of such patients' IgG preparations on functions of ventricular cardiomyocytes of neonatal rats, human smooth muscle cells from coronary arteries (hCASM); freshly isolated, human platelets as well as monocytes were investigated. For comparison, the PAR agonists thrombin and the stimulating peptide SFLLRN as well as endothelin-1 were used. While purified autoantibodies against ET(A) did not activate ERK1/2 in cardiomyocytes, IgG preparations with autoantibodies against PAR1/2 resulted in a similar activation as the peptide SFLLRN. Surprisingly, control IgG also caused a strong activation of ERK1/2. Coincubation of cardiomyocytes with antibody preparations and IL-1 β increased the phosphorylation of ERK1/2 in all cases. In hCASCs, IgG preparations with PAR-autoantibodies and control IgGs caused activation of ERK1/2, whereas ET(A)-autoantibodies did not. The results of platelet activation with patients' IgG were varying. Tests with prestimulated platelets showed, that a stimulating effect of the autoantibodies on preactivated platelets can not be excluded. However, without prestimulation patients' IgG rather seemed to have an inhibiting effect on platelet function. Preincubation of monocytes with patients' IgG had no influence on PMA-induced production of superoxide anion compared with control IgG. Only two of five patients' IgGs showed a stimulating effect on monocytic ERK1/2 phosphorylation. In conclusion, PAR1/2- and ET(A)-autoantibodies showed no common effects on the function of vascular smooth muscle cells, platelets and monocytes. The differentiation of autoantibody-positive and -negative preparations of IgG only was possible by determining the beating rate of cardiomyocytes.

autoantibody
thrombin
endothelin-1
cardiovascular
PAR
ET(A)

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	9
1 EINLEITUNG.....	11
1.1 Funktionelle Autoantikörper	11
1.1.1 Funktionelle Antikörper.....	11
1.1.2 Natürliche und Erkrankungen-assoziierte Autoantikörper	11
1.1.3 Autoantikörper gegen G-Protein-gekoppelte Rezeptoren	12
1.2 Krankheitsbilder mit Vorkommen von Autoantikörpern gegen Protease-aktivierte Rezeptoren PAR1/2 und Endothelin-Rezeptor ET(A)	12
1.2.1 Raynaud-Syndrom	13
1.2.2 Urtikaria.....	14
1.2.3 Koronare Herzkrankheit und Angina pectoris	14
1.2.4 Pulmonale Hypertonie	14
1.3 Protease-aktivierte Rezeptoren	15
1.3.1 Aufbau und Aktivierung von PARs	16
1.3.2 Funktionen von PARs im Herz-Kreislauf- und Immunsystem.....	18
1.4 Humane Endothelin-Rezeptoren.....	19
1.4.1 Aktivierung des ET(A)-Rezeptors.....	20
1.4.2 Funktionen von ET(A) im Herz-Kreislauf- und Immunsystem	20
1.5 Zielsetzung der Arbeit	21
2 MATERIAL UND METHODEN	22
2.1 Material	22
2.1.1 Chemikalien.....	22
2.1.2 Antikörper.....	23
2.1.3 Peptide	24
2.1.4 Kits.....	24
2.1.5 Utensilien.....	24
2.1.6 Geräte.....	24
2.1.7 Software.....	25

Inhaltsverzeichnis

2.1.8	Zellen	25
2.1.9	Antikörper-Präparate von Patienten.....	26
2.1.10	Antikörper-Präparate von Kontrollpersonen.....	27
2.2	Methoden	27
2.2.1	Immunglobulin-Präparation aus Serum	27
2.2.2	Affinitätschromatografische Reinigung von IgG-Präparaten	27
2.2.3	Kultur von Ventrikel-Kardiomyozyten neonataler Ratten	28
2.2.4	Kultur von glatten Muskelzellen humaner Coronararterien (hCASMCM).....	29
2.2.5	Blutentnahme	29
2.2.6	Monozytenisolierung aus humanem Vollblut	29
2.2.7	Bestimmung von Zellzahl und –vitalität.....	30
2.2.8	Stimulation von Zellen.....	30
2.2.9	Bestimmung der Pulsationsrate von Kardiomyozyten.....	31
2.2.10	Herstellen eines Zellextrakts.....	31
2.2.11	Proteinbestimmung nach Lowry	32
2.2.12	Western-Blot	32
2.2.13	Messung der Produktion von Sauerstoffradikalen	35
2.2.14	FACS-Messung	35
2.2.15	Thrombozyten-Aggregometrie	36
2.2.16	Quantifizierung von Serotonin.....	38
2.2.17	Statistische Auswertung	39
3	ERGEBNISSE	40
3.1	Charakterisierung von Autoantikörpern gegen Protease-aktivierte Rezeptoren 1 und 2 und gegen den Endothelin-Rezeptor ET(A).....	40
3.1.1	Änderung der Pulsationsrate von Kardiomyozyten durch Thrombin, das Peptid SFLLRN und Endothelin-1	40
3.1.2	Änderung der Pulsationsrate von Kardiomyozyten durch Autoantikörper gegen die Rezeptoren PAR und ET(A).....	43
3.1.3	Dosis-Wirkungskurven der PAR- und ET(A)-Autoantikörper	46
3.1.4	Spezifität der Autoantikörper gegen den Protease-aktivierten Rezeptor	47
3.1.5	Quantifizierung von pERK1/2 und p67 ^{phox} mittels Western-Blot.....	49

3.2	Untersuchungen an Glatten Muskelzellen humaner Coronararterien (hCAsMCs)	55
3.2.1	Quantifizierung von pERK1/2, Tissue Factor und p67 ^{phox} mittels Western-Blot	55
3.3	Untersuchungen an humanen Thrombozyten	62
3.3.1	Aggregometrie mit plättchenreichem Plasma und gewaschenen Thrombozyten	62
3.3.2	Aggregation und Freisetzung von Serotonin	65
3.3.3	Einfluss von Patienten-IgG auf die Thrombozytenfunktion	67
3.3.4	Einfluss von Patienten-IgG auf vorstimulierte Thrombozyten	73
3.4	Untersuchungen an humanen Monozyten	74
3.4.1	Reinheit der Monozytenpräparation	74
3.4.2	Methodenetablierung zur Messung von Sauerstoffradikalen aus Monozyten	75
3.4.3	Einfluss von Antikörper-Präparaten auf die Freisetzung von Sauerstoffradikalen	79
3.4.4	Quantifizierung von Tissue Factor und pERK1/2 in Monozyten mittels Western-Blot nach Stimulation mit Endothelin-1 oder Thrombin	81
3.4.5	Quantifizierung von Tissue Factor und pERK1/2 in Monozyten mittels Western-Blot nach Stimulation mit Antikörper-Präparaten	82
4	DISKUSSION	85
4.1	Funktion von Ventrikel-Kardiomyozyten neonataler Ratten	85
4.1.1	Nachweis und Charakterisierung von Autoantikörpern anhand der Pulsationsrate von Kardiomyozyten bei Stimulation mit Patienten-Immunglobulin	85
4.1.2	Einfluss von Serum auf die Aktivierung von ERK1/2 und die Expression von p67 ^{phox} durch Stimulanzen	86
4.1.3	Agonisten Endothelin-1, Thrombin und Peptid SFLLRN	87
4.1.4	Proinflammatorische Faktoren IL-1 β , IL-6 und LPS	88
4.1.5	Einfluss von Autoantikörpern auf die Aktivierung von ERK1/2	89
4.2	Funktion von hCAsMCs	90
4.2.1	Agonisten Endothelin-1, Thrombin und Peptid SFLLRN	90
4.2.2	Proinflammatorische Faktoren IL-1 β , IL-6 und LPS	90
4.2.3	Einfluss von Autoantikörpern auf die Aktivierung von ERK1/2	91
4.3	Thrombozytenaggregation und Serotonin-Freisetzung	92
4.3.1	Methodenetablierung Thrombozyten-Aggregometrie	92

Inhaltsverzeichnis

4.3.2	Aggregation, Slope und Serotonin-Freisetzung.....	92
4.3.3	Einfluss von Patienten-IgG auf die Thrombozytenfunktion	93
4.4	Funktion von Monozyten	94
4.4.1	Methodenetablierung zur Messung des Superoxidanions.....	94
4.4.2	Vorinkubation mit Antikörper-Präparaten zur Superoxidanion-Messung	95
4.4.3	Einfluss von Autoantikörpern auf die Produktion von Sauerstoff-Radikalen	96
4.4.4	Aktivierung von ERK1/2 und Regulation von Tissue-Factor-Protein durch Endothelin-1 und Thrombin.....	96
4.4.5	Aktivierung von ERK1/2 und Regulation von Tissue-Factor-Protein durch Autoantikörper	97
5	ZUSAMMENFASSUNG	98
	LITERATURVERZEICHNIS	100
	ANHANG.....	113
	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	118
	LEBENS LAUF	119
	DANKSAGUNG.....	120

Abkürzungsverzeichnis

A. dest.	<i>Aqua destillata</i>
Abb.	Abbildung
ACD-A	<i>Acid-Citrate-Dextrose-Anticoagulant</i>
Ach	Acetylcholin
ADP	Adenosindiphosphat
AM	Acetoxymethyl
APS	Ammoniumpersulfat
AR	adrenerger Rezeptor
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	<i>area under the curve</i>
BSA	bovines Serumalbumin
CD	<i>cluster of differentiation</i>
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
DMSO	Dimethylsulfoxid
D-PBS	<i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i>
DTT	Dithiothreitol
Durchfl.	Durchfluss
E/ml	Einheit pro Milliliter
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	[Ethylen-bis-(oxyethylenitrilo)]-tetraessigsäure
ERK1/2	<i>extracellular-signal regulated kinase 1/2</i>
ET1	Endothelin-1
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FBS	<i>fetal bovine serum</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyant
FKS	fötales Kälberserum
FUDR	5'-Fluor-2'-desoxyuridin
gew. Tbz.	gewaschene Thrombozyten
H+L	schwere und leichte Kette
hCASM	<i>human coronary artery smooth muscle cells</i>
hEGF	<i>human epidermal growth factor</i>
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure]
hFGF	<i>human fibroblast growth factor</i>
HLA	<i>human leucocyte antigen</i>
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HSA	humanes Serumalbumin
5-HT	Serotonin
IE	internationale Einheiten
IgG	Immunglobulin G
IL-1 β bzw. IL-6	Interleukin-1 β bzw. -6
KF	Kulturflasche

Abkürzungsverzeichnis

Ko.	Kontrolle
LPS	Lipopolysaccharid
MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i>
MCLA	Methyl-Cypridina-Luciferin-Analog 2-Methyl-6-(4-methoxyphenyl)-3,7-dihydroimidazo[1,2-a]pyrazin- 3-on-hydrochlorid
musc.	muscarinerg
MWCO	<i>Molecular Weight Cut Off</i>
NADPH	reduziertes Nikotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat
n.s.	nicht signifikant
neon.	neonatal
NFATc1	<i>nuclear factor of activated T-cells c1</i>
NFκB	<i>nuclear factor that binds the κ light chain enhancer in B-cells</i>
NKS	neonatales Kälberserum
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAR1	<i>protease activated receptor 1</i>
Pat.	Patient
PBMC	<i>peripheral mononuclear cells</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PE	Phycoerythrin
pERK1/2	<i>phosphorylated extracellular-signal regulated kinase 1/2</i>
PGE ₁	Prostaglandin E ₁
pH	<i>potentia hydrogenii</i>
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPP	<i>platelet poor plasma</i>
PRP	<i>platelet rich plasma</i>
Reg.	Regenerat
RLU	<i>relative luminescence units</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulphate</i>
SEM	<i>standard error of the mean</i>
SFLLRN	L-Serin — L-Phenylalanin — L-Leucin — L-Leucin — L-Arginin — L-Asparagin
SLE	Systemischer Lupus erythematodes
SmBM	<i>smooth muscle cell basal medium</i>
SmGM-2	<i>smooth muscle cell growth medium-2</i>
TBS	<i>tris buffered saline</i>
TBST	<i>tris buffered saline-tween</i>
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TF	<i>tissue factor</i>
Thr.	Thrombin
TSH	<i>thyroid stimulating hormone</i>
TV	Trypsin-Versen (EDTA)
Vorink.	Vorinkubation
YFLLRN	L-Tyrosin — L-Phenylalanin — L-Leucin — L-Leucin — L- Arginin — L-Asparagin

1 Einleitung

1.1 Funktionelle Autoantikörper

1.1.1 Funktionelle Antikörper

Funktionelle Antikörper binden spezifisch an einen Oberflächenrezeptor einer Zelle und modulieren oder stimulieren diesen. Nicht nur die Blockade des Rezeptors und die Verhinderung der Bindung des natürlichen Agonisten sind möglich (z.B. Typ I-Anti-Intrinsischer Faktor-Antikörper), sondern auch ein aktiver Einfluss auf die Zellfunktion [1]. Anti-Acetylcholinrezeptor-Antikörper zum Beispiel verursachen die Internalisierung des Rezeptors an der postsynaptischen Membran von Skelettmuskelfasern und führen zum Krankheitsbild des Myasthenia gravis. Bei der Basedow-Krankheit hingegen stimulieren Antikörper den TSH (*thyroid stimulating hormone*)-Rezeptor der Schilddrüse, die mit der Produktion der Schilddrüsenhormone reagiert.

1.1.2 Natürliche und Erkrankungen-assoziierte Autoantikörper

Autoantikörper sind Immunglobuline, die an körpereigene Antigene binden [2]. Natürliche Autoantikörper können im Serum von Gesunden gefunden werden [3]. Diese Antikörper werden unabhängig von exogenen Antigenen von B-1-Lymphozyten gebildet [4]. Die meisten Autoantikörper sind vom Isotyp IgM, aber auch IgG und IgA sind vertreten. Sie besitzen mäßige Affinität und sind oftmals polyreaktiv [4]. Natürliche Autoantikörper sind Teil des angeborenen Immunsystems. Sie reagieren nicht nur auf Selbstantigene, sondern auch auf diverse infektiöse Partikel. Insbesondere das Erkennen konservierter bakterieller Antigensequenzen deutet auf eine wichtige Rolle der natürlichen Autoantikörper für den schnell verfügbaren Immunschutz des Organismus [5].

Natürliche Autoantikörper reagieren auch auf Selbstantigene, die Ziele Autoimmunerkrankungen-assoziiierter Antikörper darstellen. Einzige bisher bekannte Unterschiede liegen in der Quantität und der genauen Epitopspezifität [6]. Dysregulationen der physiologischen Immunantwort können dazu führen, dass sich aus unfunktionellen natürlichen Autoantikörpern eine Autoimmunkrankheit entwickelt [4].

Autoantikörper, die durch verschiedenartige pathogene Effekte Zellen und Gewebe schädigen, verursachen oder begleiten Autoimmunkrankheiten. Nachweis und Quantifizierung dieser Antikörper dienen der Diagnose (Antiphospholipid-Antikörper), der Beurteilung des Krankheitsverlaufs (Anti-dsDNA-Antikörper) [1], und ermöglichen zum Teil prognostische Aussagen (z.B. Diabetes [7], Rheumatoide Arthritis [8], Systemischer Lupus erythematodes [9]). Unterschiedliche Mechanismen können Autoantikörper pathogen machen: Aktivierung von Zytotoxizität, Bindung an Rezeptoren an der Oberfläche von Zellen (siehe 1.1.1), Bildung

2. Material und Methoden

von Immunkomplexen, Translokation intrazellulärer Antigene an die Zelloberfläche, Eindringen in lebende Zellen oder Bindung an extrazelluläre Moleküle [1].

1.1.3 Autoantikörper gegen G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

Autoantikörper gegen G-Protein-gekoppelte Rezeptoren kommen vermehrt bei Patienten mit verschiedenen Herz-Kreislauf-Erkrankungen vor (siehe Tab. 1). Insofern eine agonistische Aktivität der Autoantikörper am betreffenden Rezeptor nachgewiesen kann, stellen diese Antikörper einen pathogenetischen Faktor dar. Stimulationen von intrazellulären Signalkaskaden und Effekte auf Zellfunktionen konnten bereits mehrfach nachgewiesen werden [10,11,12,13,14]. Erste Studien zum Entfernen der spezifischen Autoantikörper aus dem Blut der Patienten durch Immunadsorption lieferten positive Ergebnisse: Im Falle von Autoantikörpern gegen den β_1 -adrenergen Rezeptor konnte durch Immunadsorption der Krankheitsverlauf bei Patienten mit DCM (dilatative Kardiomyopathie) aufgehalten werden und der Zustand der Patienten besserte sich [15,16,17]. Autoantikörper gegen den Angiotensin II-Rezeptor Typ I scheinen einen pathologischen Faktor bei refraktärer Nierentransplantat-Abstoßung darzustellen [18].

Tab. 1: Autoantikörper gegen G-Protein-gekoppelte Rezeptoren [19].

Rezeptor	Vorkommen bei ...	Prävalenz Autoantikörpers	des Referenzen
α_1 -AR	Hypertonie	44 %	Fu et al., 1994 [14] Luther et al., 1997 [20]
β_1 -AR	DCM (dilatative Kardiomyopathie)	80 %	Wallukat et al., 2000 [21]
β_1 -AR	Myocarditis	80 %	Wallukat et al., 1991 [12]
β_1 -AR	Chagas-Krankheit	29 %	Elies et al., 1996 [22]
β_2 -AR	Chagas-Krankheit	12 %	Sterin-Borda et al., 1988 [23]
β_2 -AR	allergisches Asthma	keine Daten	Wallukat et al., 1987 [24], 1991 [13]
AT1	Präeklampsie	100 %	Wallukat et al., 1999 [25]
AT1	maligne Hypertonie	14-33 %	Fu et al., 2000 [26]
AT1	akzelerierte vaskuläre Nierenabstoßung	keine Daten	Dragun et al., 2002 [27]
M ₂ -musc. Rezeptor	DCM	30 %	Fu et al., 1993 [28]
5-HT ₄	SLE (system. Lupus erythematodes)	keine Daten	Eftekhari et al., 2000 [29]
nikotinerger Ach-Rezeptor	Myasthenia gravis	90 %	Lewis et al., 1995 [30]
TSH-Rezeptor	Basedow-Krankheit	>95 %	Costagliola et al., 1999 [31]

1.2 Krankheitsbilder mit Vorkommen von Autoantikörpern gegen Protease-aktivierte Rezeptoren PAR1/2 und Endothelin-Rezeptor ET(A)

1.2.1 Raynaud-Syndrom

Das Raynaud-Syndrom ist benannt nach dem Pariser Arzt Maurice Raynaud (1834-1881). Die Symptome sind „durch Vasokonstriktion (Gefäßkrämpfe) bedingte, anfallsweise auftretende Ischämiezustände meist an den Arterien der Finger“ [32]. Die typischen Anzeichen für so einen Anfall sind zunächst ausgeprägte Blässe, dann aufgrund der Mangel durchblutung eine Zyanose (Blaufärbung des Gewebes) und anschließend eine Rötung des Gewebes durch eine „schmerzhafte reaktive Hyperämie“ [32]. Es wird unterschieden zwischen dem Primären und dem Sekundären Raynaud-Syndrom:

Das primäre Raynaud-Syndrom kann durch endo- und exogene Noxen ausgelöst werden oder durch psychische Belastung [32]. Oft wird durch Kälte ein Anfall induziert [33]. Es ist „primär (...) eine Angioneurose“ bei konstitutionell-genetischer Disposition [32]. Dieses Syndrom kommt bei Frauen häufiger vor als bei Männern (4:1) [32]. Im Extremfall kann es zur Nekrose der betroffenen Region kommen.

Das Sekundäre Raynaud-Syndrom tritt auf „bei Thrombangiitis obliterans, progressiver Sklerodermie, Arteriosklerose, Halsrippen- und Scalenus-anterior-Syndrom, Kryoglobulinämie, Kälteagglutinin-krankheit, nach verschiedenen Traumen (...) und Intoxikationen (...)“ [32]. Auch Medikamente, starke Vibrationen oder das Hypothenar-Hammer-Syndrom können das Raynaud-Syndrom hervorrufen [33].



Abb. 1: Nekrotische Fingerspitze eines Patienten mit Raynaud-Syndrom, mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. Thomas Harrer, Universität Erlangen

2. Material und Methoden

1.2.2 Urtikaria

Die Urtikaria (Nesselsucht) ist ein durch Histamin vermitteltes, stark juckendes Exanthem [32]. Sie kann durch physikalische Einflüsse (z.B. Licht, Kälte, Wärme, Wasser); allergische Mechanismen (IgE-vermittelt); durch Intoleranz gegenüber Medikamenten, Kosmetika usw. oder durch Stress hervorgerufen werden [32]. Die physikalische Urtikaria ist keine Allergie [32]. Doutre et al. beschreibt ausführlich die Rolle von Immunzellen und deren freigesetzten Mediatoren bei der Pathophysiologie von Urtikaria [34].

1.2.3 Koronare Herzkrankheit und Angina pectoris

Die koronare Herzkrankheit (KHK) zeichnet sich aus durch atherosklerotische Herzkranzgefäße. Thrombusbildung und Leukozyten-Infiltration der Gefäßwände können zu einem Angina-Pectoris-Anfall führen. Furman et al. wiesen in Patienten mit stabiler KHK einen erhöhten Anteil zirkulierender aktivierter (degranulierter) Thrombozyten und Monozyten-Thrombozyten-Aggregate nach [35]. Golino et al. beschreiben Zusammenhänge zwischen intrakoronarer Thrombose an atherosklerotischen Plaques und thrombozytären Mediatoren, die zusätzlich die koronare Vasokonstriktion fördern [36]. Die Rolle von Thrombozyten bei der instabilen Angina pectoris wird u.a. beschrieben von Machado et al. [37].

Die Angina pectoris ist eine „akute Koronarinsuffizienz mit plötzlich einsetzenden, Sekunden bis Minuten anhaltenden Schmerzen im Brustkorb (...), die in die linke (rechte) Schulter-Arm-Hand-Region bzw. Hals-Unterkiefer-Region ausstrahlen, häufig gürtelförmiges Engegefühl um den Brustkorb mit Ersticken mit Atemnot bis zu Vernichtungsgefühl und Todesangst“ [32]. Die Ursachen können sein koronare Herzkrankheit, Koronarspasmen oder Störungen des Blutflusses durch Stenose, Herzrhythmus- oder Blutdruckstörungen [32]. Die Angina pectoris kann einen Herzinfarkt ankündigen. Neben der medikamentösen Behandlung kann das chirurgische Legen eines aortokoronaren Bypasses indiziert sein. Dabei wird meist eine autologe Arterie oder Vene als Verbindung zwischen Aorta und Koronararterie mit Umgehung der Gefäßstenose angelegt [32].

1.2.4 Pulmonale Hypertonie

Ein Hochdruck im Lungenkreislauf entsteht durch idiopathische Gefäßwandveränderungen (primäre, sehr seltene Form) oder bei Linksherzfehlern, Pulmonalvenenobstruktion, Lungenparenchymerkrankungen und Pulmonalarterienveränderungen (sekundäre Formen) [32]. Meist ist eine Rechts-Herzinsuffizienz die Folge mit stark eingeschränkter körperlicher Leistungsfähigkeit. Weitere Symptome sind „Kreislaufstörungen, Angina pectoris, Raynaud-Syndrom, periphere Ödeme und Müdigkeit“ [http://de.wikipedia.org/wiki/Pulmonale_Hypertonie]. Häufig beobachtet werden thrombotische Läsionen, anhaltende Vasokonstriktion und strukturelle Veränderungen der pulmonalen Arterien [38].

Für die Therapie der PAH (Pulmonale Arterielle Hypertonie) werden in Deutschland zur Zeit die Endothelin-Antagonisten Bosentan und Sitaxsentan, das Prostanoid Iloprost-Aerosol und der Phosphodiesterase-5-Inhibitor Sildenafil empfohlen, neuerdings auch der selektive ET(A)-Rezeptor-Antagonist Sitaxsentan [39,40,41].

1.3 Protease-aktivierte Rezeptoren

Serin-Proteasen fungieren nicht nur über die Spaltung von extrazellulären Proteinen sondern auch über die Auslösung intrazellulärer Signale an entsprechenden Rezeptoren. Es gibt mindestens drei Familien solcher Rezeptoren: Ein-Transmembrandomänen-Rezeptoren (z.B. für Koagulationsfaktor Xa [42]), Glycosylphosphatidylinositol-verbundene Rezeptoren (z.B. für Urokinase [43]) und G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die durch Proteolyse aktiviert werden [44]. Mitglieder der letzteren Rezeptorfamilie werden im Allgemeinen als Protease-aktivierte Rezeptoren, PARs, bezeichnet. Tab. 2 listet die bisher beschriebenen PARs auf.

Tab. 2: PARs und ihr Vorkommen im humanen Herz-Kreislauf- und Immunsystem

Rezeptor	Agonisten	Vorkommen	Referenzen
PAR1	Thrombin	Endothelzellen, glatte Gefäßmuskulzellen, Kardiomyozyten, Mastzellen, Monozyten, Makrophagen, T-Lymphozyten, Thrombozyten	Vu et al. 1991 [45], Colognato et al. 2003 [46], Li und He 2006 [47]
PAR2	Trypsin, Tryptase, Faktor VIIa, Faktor Xa	Endothelzellen, glatte Gefäßmuskulzellen, Eosinophile, Fibroblasten, Kardiomyozyten, Mastzellen, Makrophagen, Neutrophile, T-Lymphozyten	Nystedt et al. 1994 [48], Belham et al. 1996 [49], Camerer et al. 1996 [50], Mirza et al. 1997 [51], Molino et al. 1997 [52], Bretschneider et al. 1999 [53], Camerer et al. 2000 [54], Colognato et al. 2003 [46], Li und He 2006 [47]
PAR3	Thrombin	Endothelzellen, Monozyten, Makrophagen, T-Lymphozyten	Ishihara et al. 1997 [55], Colognato et al. 2003 [46], Li und He 2006 [47]
PAR4	Thrombin, Cathepsin G	Thrombozyten	Xu et al. 1998 [56], Kahn et al. 1998 [57], Selak et al. 1988 [58], Sambrano et al. 2000 [59]

2. Material und Methoden

1.3.1 Aufbau und Aktivierung von PARs

PARs sind Membranproteine mit sieben transmembranalen Domänen. Der NH₂-Terminus liegt extrazellulär, der COOH-Terminus intrazellulär. Die Serin-Protease interagiert mit dem Rezeptor an der Erkennungssequenz und spaltet den Rezeptor spezifisch am NH₂-Terminus. Die Peptidsequenz am neu entstandenen NH₂-Terminus wirkt wie ein rezeptoreigener Ligand und führt zur Selbstaktivierung des Rezeptors. Nach einer Konformationsänderung des Rezeptors erfolgt die Aktivierung eines G-Proteins in der Plasmamembran [44]. Peptide, die der rezeptoreigenen Ligandensequenz entsprechen, können ohne Spaltung durch eine Protease den Rezeptor aktivieren. Das in dieser Arbeit verwendete Peptid SFLLRN aktiviert auf diese Weise PAR1 und PAR2 [60].

Abb. 2 zeigt eine schematische Darstellung von PAR1 [61]. Dessen Aktivierung kann durch jede Protease erfolgen, die zwischen Arg⁴¹ und Ser⁴² spaltet. Das können außer Thrombin auch Faktor VIIa und Faktor Xa/APC (*anticoagulant-activated protein C*) sein [61]. Andere Protease-Spaltungsstellen dienen möglicherweise der Beendigung des Signals vom aktivierten Rezeptor neben der Rezeptorinternalisierung [62] oder verhindern dessen Aktivierung [63,64].

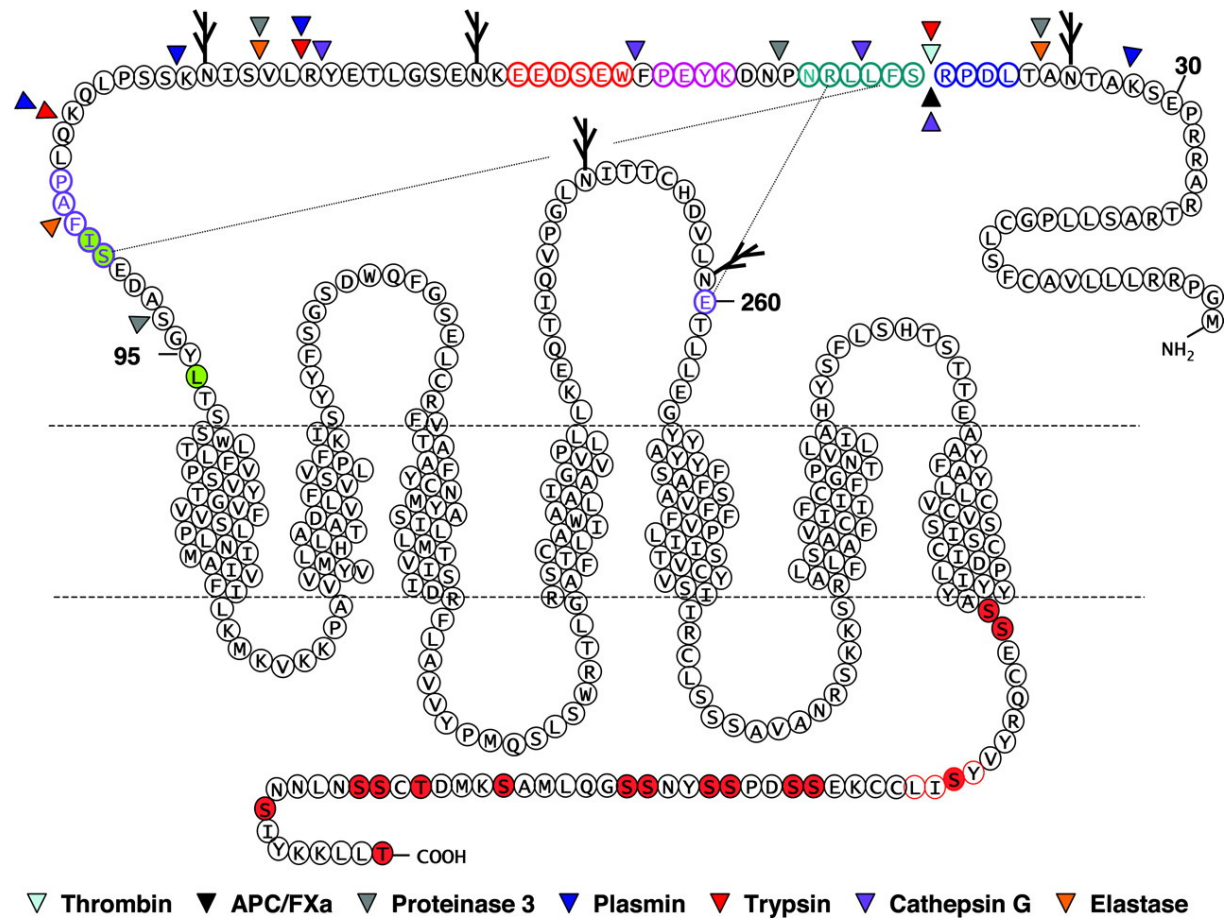


Abb. 2: Schematische Darstellung von PAR1 [61]. Aufgeführt sind mögliche Spaltungsstellen von Proteasen [65]. Blau: Domäne mit Einfluss auf Bindung und Katalyse von Thrombin. Grün: receptoreigener Ligand. Pink: Thrombin-Bindungsstelle. Rot: Cluster saurer Aminosäuren. Lila: mutmaßliche Liganden-Bindungsstelle. Grün gefüllt: Aminosäuren in der mutmaßlichen Liganden-Bindungsstelle, bei denen eine Alanin-Substitution zu einer defekten PAR1-Aktivierung durch SFLLRN führt aber nicht durch Thrombin [66]. Rot gefüllt: Serin- oder Threoninreste als mögliche Phosphorylierungsstellen der G-Proteingekoppelten Rezeptorkinase. Rot umkreiste Aminosäuren C-terminal: Motiv für Verschiebung und Internalisierung von PAR1.

Tab. 3: Mechanismen der Signaltransduktion von PARs

Rezeptor	G-Protein	intrazelluläre Signalkaskade	Referenzen
PAR1	G _{12/13}	Rho-abhängige Veränderungen des Zytoskeletts	Vouret-Craviari et al. 1998 [67]
	G _q	Phospholipase C, IP ₃ , DAG, Ca ²⁺ , Proteinkinase C, MAPK etc.	Taylor et al. 1991 [68]
	G _i	Inhibition der Adenylatcyclase	Katada et al. 1984 [69], Levitzki und Bar-Sinai 1991 [70]
PAR2	G _q /G ₁₁	Phospholipase C, IP ₃ , DAG, Ca ²⁺ , Proteinkinase C, MAPK etc.	Nystedt et al. 1995 [71], Belham et al. 1996 [49], Sabri et al. 2000 [72]
	G _o /G _i	Ca ²⁺ , Inhibition der Adenylatcyclase	Schultheiss et al. 1997

2. Material und Methoden

Rezeptor	G-Protein	intrazelluläre Signalkaskade	Referenzen
			[73], Yu und Hinkle 1997 [74], MacFarlane et al. 2001 [75]
PAR3	keine Angabe	IP3, DAG	Ishihara et al. 1997 [55]
PAR4	G _q	siehe oben	Xu et al. 1998 [56]
	G _{12/13}	siehe oben	

1.3.2 Funktionen von PARs im Herz-Kreislauf- und Immunsystem

Bei humanen Thrombozyten ist PAR1 gegenüber PAR4 der bedeutendere Thrombinrezeptor. Schon geringe Thrombinkonzentrationen führen zu einer Thrombozytenaktivierung über PAR1. Bei Blockade von PAR1 erfolgt die Aktivierung über PAR4 nur mit hohen Thrombinkonzentrationen [76]. Thrombin bewirkt den Formenwandel (*shape change*), die Granulaentleerung [77] und die Synthese und Ausschüttung von Thromboxan A₂ [78]. Außerdem wird P-Selektin mobilisiert und CD40-Ligand wird an die Thrombozytenoberfläche befördert [79]. Das Integrin α IIb/ β 3 wird aktiviert [80], was die Thrombozytenaggregation einleitet. Thrombin fördert die prokoagulatorische Aktivität an der Thrombozytenoberfläche [81].

Thrombin aktiviert Endothelzellen und fördert so die Anheftung von Thrombozyten und Leukozyten [82]. Durch einen Formenwandel der Endothelzellen können Plasmaproteine aus dem Gefäß austreten und Ödeme werden gefördert [83,84]. Vermittelt über das Endothel bewirkt Thrombin eine Vasodilatation [82]. Mirza et al. zeigten, dass die Aktivierung von PAR2 an Endothelzellen mitogene Effekte hervorruft [85]. Sowohl die Aktivierung von PAR1 als auch von PAR2 an Endothelzellen induziert eine erhöhte TF (*tissue factor*)-Aktivität [86].

Es konnte gezeigt werden, dass Thrombin an glatten Gefäßmuskelzellen in vitro über die intrazellulären Signalwege der MLCK (*myosin light chain kinase*) und der MAPK (*mitogen-activated protein kinases*) eine Kontraktion auslöst [87]. Außerdem reguliert Thrombin an glatten Gefäßmuskelzellen die Zytokinproduktion und wirkt mitogen [82].

Thrombin kann pro- und antiinflammatorische Effekte hervorrufen [88]. Vergnolle et al. konnten zeigen, dass die Aktivierung von PAR1 Ödeme fördert. Die Aktivierung von Mastzellen spielt dabei eine bedeutende Rolle. Antiinflammatorische Thrombin-Effekte unabhängig von PAR1 wurden ebenso beobachtet, der Mechanismus konnte jedoch bisher nicht geklärt werden [88]. Die Aktivierung von PAR2 an Endothelzellen und inflammatorischen Zellen bewirkt eine Entzündungsreaktion mit Ödembildung und Granulozyteninfiltration, zum großen Teil unabhängig von einer Mastzellaktivierung [89]. PAR1- und PAR2-Agonisten induzieren die Ausschüttung von IL-6 aus T-Lymphozyten [47]. Thrombin verstärkt die Zytotoxizität von NK (*natural killer*)-Zellen, jedoch inhibiert Thrombin auch die Zytotoxizität von LAK (*lymphokine activated killer*)-Zellen [90].

Monozyten und Makrophagen zeigen durch Stimulation mit Thrombin eine erhöhte Expression von MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*) [46]. Des Weiteren erhöht Thrombin an diesen Zellen die Produktion diverser proinflammatorischer Zytokine und stimuliert die Phagozytoseaktivität [91,92]. Außerdem führt Thrombin zu einer verstärkten

monozytären Expression von PF4 (*platelet factor 4*), PBP (*platelet basic protein*) und MIP1 α (*macrophage-inflammatory protein-1 α*) [92].

Auch die Funktion von Nervenzellen wird über PAR1 und PAR2 moduliert [93]. Die Ausschüttung der inflammatorischen Neuropeptide CGRP (*calcitonin gene-related protein*) und SP (Substanz P) fördert die Ödembildung [94].

1.4 Humane Endothelin-Rezeptoren

Endothelin (ET) ist ein 21-Aminosäuren-Peptid [95]. Im humanen Genom wurden Sequenzen von drei solcher Peptide entdeckt und als ET-1, ET-2 und ET-3 bezeichnet [96]. Das aktive Endothelin-1 entsteht beim Menschen aus dem Vorläufer bigET-1, das durch das Enzym ECE (*endothelin-converting enzyme*) gespalten wird [97]. Der Vorläufer von bigET-1 wiederum ist preproET-1 [98].

Die Rezeptoren ET(A) und ET(B) wurden von Arai et al. [99] bzw. Sakurai et al. [100] näher charakterisiert. Beide Subtypen gehören zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren [101]. Sie bestehen aus der extrazellulären NH₂-terminalen Region, sieben transmembranalen Helices und dem zytoplasmatischen COOH-Terminus [102]. Der ET(A)-Rezeptor zeigt eine hohe Affinität zu ET-1 (Abb. 3) und ET-2, aber eine niedrige Affinität zu ET-3. Die Affinitäten des ET(B)-Rezeptors zu allen drei Endothelin-Isoformen sind gleich [101]. Beide Rezeptoren besitzen eine Domäne für die spezifische Liganden-Selektion sowie eine Domäne für die Bindung des Liganden [103].

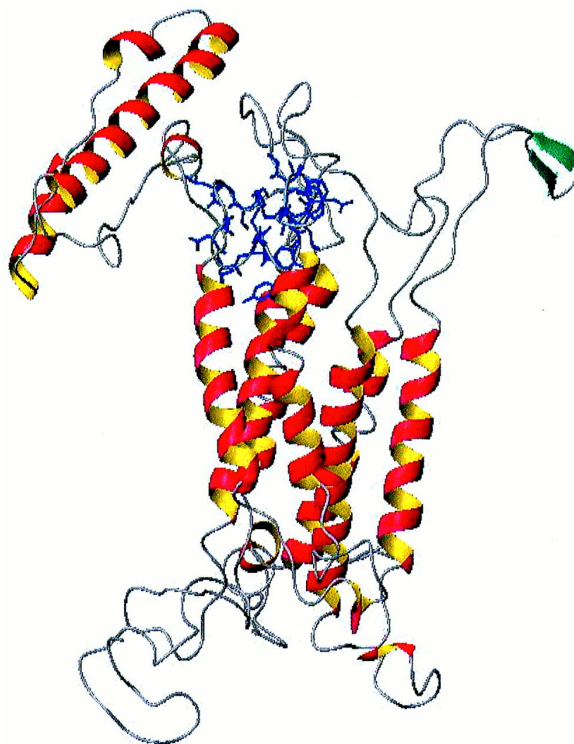


Abb. 3: Berechnete Vorhersage der Interaktion von Endothelin-1 (blau) mit dem Rezeptor ET(A) [104].

2. Material und Methoden

1.4.1 Aktivierung des ET(A)-Rezeptors

Die Rezeptoren ET(A) und ET(B) können je nach Zelltyp an ein G_s -, G_i - oder G_q -Protein gekoppelt sein [105]. Wie von Sugden und Clerk [106] anhand von Herzmuskelzellen beschrieben stimuliert die Bindung von ET-1 an den G_q -gekoppelten ET(A)-Rezeptor die Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphat zum membranständigen Diacylglycerol (DAG) und löslichen Inositol-1, 4, 5-triphosphat. Es folgt die DAG-abhängige Aktivierung der Proteinkinase C (PKC). Das membrangebundene kleine G-Protein Ras wechselt die Bindung von GDP zu GTP. Über Ras-GTP werden MAPKKK (*mitogen-activated protein kinase kinase kinases*) der Raf-Familie aktiviert. Die MAPK ERK1/2 (*extracellular signal-regulated kinases 1/2*) werden phosphoryliert, etwas verzögert auch die MAPK cJNK (*c-Jun N-terminal kinase*) und p38 [106]. Versuche von Arai et al. mit kultivierten neonatalen Kardiomyozyten der Ratte weisen auf die Aktivierung von JNK über $G_{12/13}$ und G_q einerseits und die Aktivierung von ERK über G_i und die $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheit andererseits [107].

ET-1 aktiviert über ET(A) die zytosolische Phospholipase A_2 (cPLA $_2$) über PKC und ERKs wie gezeigt für glatte Gefäßmuskelzellen der Ratte [108]. Anhand humaner glatter Muskelzellen des Perikardiums konnte nach ET(A)-Stimulation eine PLA $_2$ -vermittelte Arachidonsäure-Ausschüttung nachgewiesen werden [109]. Für choroidale arterielle Muskelzellen konnte gezeigt werden, dass ET-1 über den Rezeptor ET(A) einen Ca^{2+} -aktivierten Cl^- -Einstrom erzeugt [110].

1.4.2 Funktionen von ET(A) im Herz-Kreislauf- und Immunsystem

Die Produktion und Ausschüttung von Endothelin-1 aus Endothelzellen wird u.a. durch hämodynamische Kräfte, Zytokine und Thrombin stimuliert [98,101]. Endothelin-Rezeptoren regulieren Vasokontraktion und -dilatation. Die Kontraktion wird über ET(A) an glatten Gefäßmuskelzellen ausgelöst, während über ET(B) an Endothelzellen die Ausschüttung von NO und Prostazyklin vermittelt wird [111]. Endothelin-1 induziert in physiologischer Konzentration die Kontraktion durch die Aktivierung nicht-selektiver Kation-Kanäle und daraus resultierender Erhöhung des zytosolischen Calciumionen-Levels [101,112,113]. NO inhibiert die ET-1 induzierte Kontraktion [114].

Thrombozyten besitzen die Rezeptoren ET(A) und ET(B), jedoch sind Effekte von Endothelin-1 an Thrombozyten umstritten [115]. Auch das Wachstum vieler Zellarten, z.B. von Thymuszellen, Endothelzellen und glatten Muskelzellen, wird von Endothelin-1 angeregt. Dies geschieht hauptsächlich über den Rezeptor ET(A) [101,116].

Anhand eines Mausmodells einer allergischen Entzündung demonstrierten Sampaio et al. den Beitrag von Endothelin zu allergischen Reaktionen durch Akkumulation von Neutrophilen Granulozyten und T-Lymphozyten [117]. Zusätzliche antigene Stimulation führte zu verstärkter, ET(A)-abhängiger Migration von Eosinophilen Granulozyten und Mononukleären Zellen [117]. Laut Guruli et al. sind ET-1 und die Rezeptoren ET(A) und ET(B) essentiell für die Reifung und Funktion von Dendritischen Zellen [118].

Es ist allgemein anerkannt, dass Endothelin bei vielen Gefäßerkrankungen eine Rolle spielt: Bei Herzerkrankungen, Pulmonaler Hypertonie, Spasmen von Blutgefäßen im Gehirn, akutem

Nierenversagen und essentieller Hypertonie ist der Plasma-Endothelin-1-Level erhöht und Endothelin-Rezeptor-Antagonisten führen zu einer Verbesserung der Symptomatik [119,120]. Boussette und Giaid diskutierten die Rolle von Endothelin-1 bei Vaskulopathien durch Induktion von Vasokonstriktion, Mitogenese, Adhäsion von Neutrophilen Granulozyten, Thrombozyten-Aggregation und einer vermehrten Bildung reaktiver Sauerstoffspezies [121].

1.5 Zielsetzung der Arbeit

In dieser Arbeit sollen Autoantikörper gegen die Rezeptoren PAR1/2 und ET(A) im System spontan pulsierender Kardiomyozyten charakterisiert werden. Anhand von Untersuchungen zur agonistischen Aktivität dieser Autoantikörper an Kardiomyozyten aber auch an anderen Zellen des Herz-Kreislauf-Systems sollen Hinweise auf mögliche pathogene Mechanismen bei Raynaud-Syndrom und bei Herz-Kreislauf-Erkrankungen gefunden werden. Dabei soll der Einfluss von bekannten PAR1/2- und ET(A)-Agonisten mit Autoantikörpern aus IgG-Präparaten hinsichtlich der Zellfunktion verglichen werden. Möglicherweise könnte eine alternative Methode zum Nachweis der Autoantikörper entwickelt werden.

An Kardiomyozyten soll neben der Pulsationsraten-Bestimmung die Aktivierung der MAPK (*mitogen activated protein kinase*) ERK1/2 (*extracellular-signal regulated kinase 1/2*) als ein Bestandteil der intrazellulären Signaltransduktion untersucht werden. Das Enzym NADPH-Oxidase, das in der Zytoplasmamembran lokalisiert ist, produziert reaktive Sauerstoff-Spezies. Über den Proteinlevel einer Untereinheit dieser Oxidase, p67^{phox}, soll die Aktivierung dieser Zellfunktion beurteilt werden.

An glatten Gefäßmuskelzellen (hCASMCs) soll die Wirkung verschiedener Stimulanzien und isolierter Autoantikörper auf die TF-Proteinexpression und Aktivierung von ERK1/2 dargestellt werden. Außerdem wird wie bei den Kardiomyozyten der Proteinlevel von p67^{phox} bestimmt.

Durch Adhäsion, Aggregation und Mediatoren-Freisetzung im Bereich einer Läsion der Blutgefäßwand übernehmen Thrombozyten eine wichtige Funktion bei der Hämostase. Aktivierte Thrombozyten setzen u.a. Serotonin aus den elektronendichten Granula frei. Die Thrombozyten-Aggregation und die Serotonin-Freisetzung unter dem Einfluss von Autoantikörpern sollen in dieser Arbeit untersucht werden. Die Methode der Thrombozyten-Aggregometrie muss zunächst im Labor etabliert werden.

Bei einer Entzündungsreaktion in der Gefäßgegend finden vielfältige Wechselwirkungen zwischen glatten Gefäßmuskelzellen, Endothelzellen, Monozyten und Thrombozyten statt. Aktivierte Monozyten produzieren reaktive Sauerstoff-Spezies und exprimieren TF (*tissue factor*). Über diesen Faktor erfolgt die extrinsische Aktivierung der Koagulationskaskade. Die monozytäre Aktivierung der NADPH-Oxidase, die Expression des TF-Proteins und die Aktivierung von ERK1/2 sollen hier untersucht werden. Für ersteres soll zunächst eine Methode zur Messung von Sauerstoff-Radikalen etabliert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Bezeichnung	Firma
Adenosin-5-diphosphat	OEM Produkt H. Diagnostics, U.K.
Albumin bovin Fraktion V	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Ammoniumpersulfat	Serva Feinbiochemica Heidelberg, Deutschland
Aprotinin aus Rinderlunge	Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA
Aqua ad iniectabilia	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Bromphenolblau	Feinchemie K.-H. Kallies KG, Sebnitz, Deutschland
BQ610	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
BQ788	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Calcein-AM	Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA
Calciumchlorid Dihydrat	J.T. Baker B.V., Deventer, Niederlande
Collagen	Bio/Data Corporation, Horsham, PA, USA
Developer for medical x-ray film processing	Agfa-Gevaert N.V., Mortsel, Belgien
di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Dithiothreitol	Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Deutschland
DMSO	Serva Feinbiochemica Heidelberg, Deutschland
EDTA	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
EGTA	Schuchardt München, München, Deutschland
Endobulin	Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland
Endothelin 1 human	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Ethanol	Berkel AHK Alkoholhandel GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland
Ficoll-Paque TM Plus	GE Healthcare UK Limited, Little Calfont, England
Gentamycin	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Glucose, D-(+)-	Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA
Glycerol	ICN Biomedicals, Inc., Aurora, Ohio, USA
Glycin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Heparin-Natrium-25 000-ratiopharm [®]	Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland
HEPES	Serva Feinbiochemica Heidelberg, Deutschland
Interleukin-1 β , human, rekombinant	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Interleukin-6, human, rekombinant	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Isotone Kochsalz-Lösung 0,9%	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Kaliumchlorid	Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA
Kaliumdihydrogenphosphat	Serva Feinbiochemica Heidelberg, Deutschland
Kaliumthiocyanat	Merck KGaA Darmstadt, Deutschland
Leupeptin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

Bezeichnung	Firma
Lipopolysaccharid von Escherichia coli O55:B5	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Magermilchpulver	TSI GmbH & Co. KG, Zeven, Deutschland
Magnesiumchlorid Hexahydrat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
MCLA	Molecular Probes, Eugene, OR, USA
Methanol	Merck KGaA Darmstadt, Deutschland
Natrium-beta-glycerophosphat	Merck KGaA Darmstadt, Deutschland
Natriumbicarbonat	Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumcitrat Dihydrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Natriumfluorid	Nüchritz, DDR
Natriumhydrogenphosphat Dihydrat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydroxid	Chemapol, Prag, Tschechische Republik
Natriumorthovanadat	Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA
Natriumpyrophosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Penicillin „Grünenthal“ 1 Mega	Grünenthal GmbH, Aachen, Deutschland
Perchlorsäure	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Phenolrot	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
PMA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
PMSF	Serva Feinbiochemica Heidelberg, Deutschland
Ponceau S-Lösung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Precision Plus Protein™ All Blue Standards	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA
Rapid Fixer	Agfa-Gevaert N.V., Mortsel, Belgien
Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
RPMI-1640 Medium	Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA
SDS	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Strepto-Hefa	Sanavita AG & Co., Werne, Deutschland
TEMED	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Thrombin, aus humanem Plasma	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Tris	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	Serva Feinbiochemica Heidelberg, Deutschland
Trypsin NB	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Tumor Nekrosis Faktor- α , human, rekombinant	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Tween®-20	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Ziegenserum	Serotec Ltd., Oxford, UK
Zitronensäure	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

2.1.2 Antikörper

Bezeichnung	Firma
Maus-anti-human-CD14, FITC-konjugiert	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Maus-anti-human-HLA-DR, PE-konjugiert	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Maus-anti-p67 ^{phox} , Klon 29	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Maus-anti-Tissue-Factor, monokl., VIC7	zur Verfügung gestellt von Dr. T. Luther, Institut für Pathologie, Dresden, Deutschland
Maus-IgG _{2a} -Isotypkontrolle, FITC-konjugiert	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Maus-IgG _{2a} -Isotypkontrolle, PE-konjugiert	BD Biosciences, San Jose, CA, USA

2. Material und Methoden

Phospho-p44/42 MAPK E10 Monoklonaler Antikörper
Ziege-anti-Maus-IgG (H+L), Peroxidase-konjugiert

Cell Signalling Technology, Inc., Danvers, MA, USA

Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA, USA

2.1.3 Peptide

Peptid	Firma
SFLLRN	Biosyntan, Berlin, Deutschland
YFLLRN	
LNITTCHDVL (PAR1/2, extrazellulärer Loop II, human), biotinyliert	
MLNATSKFMEFY (ET(A)-Rezeptor, extrazellulärer Loop II, human), biotinyliert	

2.1.4 Kits

Bezeichnung	Firma
D _c Protein Assay Kit	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA
ECL TM Western Blotting Analysis System	GE Healthcare UK Limited, Little Calfont, England
Monocyte Negative Isolation Kit	Dynal [®] Biotech ASA, Oslo, Norwegen
SmGM-2 BulletKit	Cambrex Bio Science Walkersville, Inc., Walkersville, MD, USA

2.1.5 Utensilien

Bezeichnung	Firma
Dialyserschlauch Visking, MWCO 14.000	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Dynal MPC [®] -1 Magnetpartikelkonzentrator	Dynal [®] Biotech ASA, Oslo, Norwegen
Dynal MPC [®] -S Magnetpartikelkonzentrator	Dynal [®] Biotech ASA, Oslo, Norwegen
Hybond TM -ECL TM Nitrocellulose membrane	GE Healthcare UK Limited, Little Calfont, England
Leucosep [®]	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Neubauer improved Zählkammer	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland
Parafilm „M“ [®]	American National Can TM , Greenwich, CT, USA
Safe-Lock Tubes 0,5 ml, 1,5 ml und 2,0 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Test Tubes 8.75×50 mm	Bio/Data Corporation, Horsham, PA, USA
x-ray Retina Medizinischer Röntgenfilm XBA	Fotochemische Werke GmbH, Berlin, Deutschland
Zellkultur Testplatte 96F	TPP AG, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturflaschen 12,5 cm ²	Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, USA
Zellkulturflaschen 25 cm ²	TPP AG, Trasadingen, Schweiz
Zellschaber 24 cm	TPP AG, Trasadingen, Schweiz

2.1.6 Geräte

Bezeichnung	Firma
Aggregometer PAP-4	Bio/Data Corporation, Horsham, PA, USA
Biofuge fresco	Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Deutschland

2. Material und Methoden

FACS Calibur	Becton Dickinson Heidelberg, Deutschland
Fluoroskan Ascent FL	Labsystems Oy, Helsinki, Finnland
HPLC: DGU-3A Degasser, SIL-10A Auto Injector, FCV-10AL, CTO-10AC Column Oven, RF-10A _{XL} Fluorescence Detector, CBM-10A Communications Bus Module, LC-10AD Liquid Chromatograph	Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan
HPLC-Säule 218TP104	Grace/Vydac [®] , Hesperia, CA, USA
Laborzentrifuge 4K10	Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode, Deutschland
Mikroplatten-Absorptionsfotometer anthos htII	Anthos Mikrosysteme GmbH, Krefeld, Deutschland
Mikroskop IMT-2	Olympus Corporation, Tokyo, Japan
Mini PROTEAN II Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Mini Trans-Blot [®] Electrophoretic Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
pH Meter 523	WTW, Weilheim, Deutschland
pH-Elektrode SenTix 21	WTW, Weilheim, Deutschland
Power Pac 200, 300 und 1000	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Rollinkubator Roller SRT1	Stuart Scientific Co. Ltd., Redhill, UK
Scanner 420oe	PDI, Inc., New York, NY, USA
Taumelschüttler Polymax 2040	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Vortex Genie 2 [™]	Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz
„Mini-Spin“ Tischzentrifuge	Appligene Oncor, Illkirch, Frankreich

2.1.7 Software

Bezeichnung	Firma
Ascent Software Version 2.6 (für Fluoroskan)	Thermo Labsystems Oy, Helsinki, Finnland
CLASS-LC 10 (für HPLC), Version 1.64A, 3.81 CBM-10A	Shimadzu Chemical Laboratory Analysis System & Software, Kyoto, Japan
Imagoquant Fourieranalyse 100	Mediquant GmbH, Lützen, Deutschland
Prism [®] 4 for Windows, Version 4.00	GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA
Quantity One [®] Version 3.0 (für Scanner)	PDI, Inc., New York, NY, USA

2.1.8 Zellen

Bezeichnung	Firma
hCASMIC	Cambrex Bio Science Walkersville, Inc., Walkersville, MD, USA

2. Material und Methoden

2.1.9 Antikörper-Präparate von Patienten

Tab. 4: Antikörper-Präparate von Patienten. Über die Bestimmung der Pulsationsrate von Kardiomyozyten (siehe 2.2.9) ist die Aktivität vorhandener Autoantikörper ermittelt. Zur Präparation durch Ammoniumsulfatfällung siehe 2.2.1, Affinitätschromatografie siehe 2.2.2. (KHK: koronare Herzkrankheit, PHT: Pulmonale Hypertonie)

Nummer	Autoantikörper gegen ...	Art der Präparation	Diagnose	Geschlecht
Patient 1	PAR, ET(A)	Ammoniumsulfatfällung	KHK, Bypass	♂
Patient 2	PAR	Ammoniumsulfatfällung	Angina pectoris, Raynaud-Syndrom	♂
Patient 3	PAR, ET(A)	Ammoniumsulfatfällung	Raynaud-Syndrom	♀
Patient 4	PAR, ET(A)	Ammoniumsulfatfällung	Angina pectoris	♂
Patient 5	PAR, ET(A)	Ammoniumsulfatfällung	Angina pectoris, Raynaud-Syndrom	♂
Patient 6 Patient 6a	PAR, ET(A), β_2 ET(A)	Ammoniumsulfatfällung Affinitätschromatografie	Raynaud-Syndrom	♀
Patient 10	PAR	Ammoniumsulfatfällung	Angina pectoris, Bypass	♂
Patient 11	PAR, ET(A)	Ammoniumsulfatfällung	Angina pectoris, Bypass	♀
Patient 12	PAR, ET(A)	Ammoniumsulfatfällung	KHK, Bypass	♀
Patient 13	PAR	Ammoniumsulfatfällung	KHK, Bypass	♂
Patient 14	PAR, ET(A), β_2	Ammoniumsulfatfällung	Raynaud-Syndrom	♂
Patient 15	PAR	Ammoniumsulfatfällung	Urtikaria	♀
Patient 16	PAR	Ammoniumsulfatfällung	Raynaud-Syndrom	♀
Patient 17	PAR	Ammoniumsulfatfällung	Raynaud-Syndrom	♀
Patient 18	PAR	Ammoniumsulfatfällung	Raynaud-Syndrom	♀
Patient 19	PAR	Ammoniumsulfatfällung	Raynaud-Syndrom	♀
Patient 20	PAR	Ammoniumsulfatfällung	Raynaud-Syndrom	♀
Patient 21a	ET(A)	Affinitätschromatografie	PHT	♀
Patient 22a	ET(A)	Affinitätschromatografie	PHT	♂
Patient 23a	ET(A)	Affinitätschromatografie	Prostataadenom	♂
Patient 24	PAR	Ammoniumsulfatfällung	Raynaud-Syndrom	♀
Patient 25	PAR	Ammoniumsulfatfällung	Raynaud-Syndrom	♂

2.1.10 Antikörper-Präparate von Kontrollpersonen

Tab. 5: Antikörper-Präparate von Kontrollpersonen. Tests auf verschiedene Antikörperspezifitäten über die Bestimmung der Pulsationsrate von Kardiomyozyten (siehe 2.2.9) sind negativ. Zur Präparation durch Ammoniumsulfatfällung siehe 2.2.

Nummer	Art der Präparation	Geschlecht
Kontrolle 1	Ammoniumsulfatfällung	♀
Kontrolle 2	Ammoniumsulfatfällung	♀
Kontrolle 3	Ammoniumsulfatfällung	♀
Kontrolle 4	Ammoniumsulfatfällung	♀
Kontrolle 5	Ammoniumsulfatfällung	♀
Kontrolle 6	Ammoniumsulfatfällung	♀
Kontrolle 7	Ammoniumsulfatfällung	♀
Kontrolle 8	Ammoniumsulfatfällung	♂
Kontrolle 9	Ammoniumsulfatfällung	♀
Kontrolle 10	Ammoniumsulfatfällung	♀
Kontrolle 11	Ammoniumsulfatfällung	♂

2.2 Methoden

2.2.1 Immunglobulin-Präparation aus Serum

Die Immunglobuline wurden aus den Seren wie folgt präpariert: In einem 2 ml-Reaktionsgefäß werden zu 1 ml Serum tropfenweise 660 µl einer gesättigten Ammoniumsulfatlösung (Endkonzentration 40 %) unter Rühren zugegeben. Nach einer Inkubation bei 4°C für 18 h folgt eine Zentrifugation bei $6.000 \times g$ bei 4°C für 15 min. Der Überstand wird entfernt. Das Pellet wird in 750 µl PBS-Dialysepuffer aufgenommen und mit Hilfe des Vortex-Gerätes vermischt. Anschließend wird tropfenweise 750 µl einer gesättigten Ammoniumsulfatlösung (Endkonzentration 50 %) zugegeben und mit dem Vortex-Gerät vermischt. Nach erneuter Zentrifugation ($6.000 \times g$ bei 4°C für 15 min) wird dieser Resuspendierungsschritt noch einmal wiederholt. Anschließend wird das Pellet in 700 µl PBS-Dialysepuffer gelöst und gegen einen PBS-Dialysepuffer drei Tage lang dialysiert. Das Volumenverhältnis von Probe zu Puffer ist 1:100. Die Dialyse erfolgt bei 4°C und der Puffer wird täglich zweimal gewechselt. Die erhaltene IgG-Fraktion wird bei -20°C gelagert.

2.2.2 Affinitätschromatografische Reinigung von IgG-Präparaten

Biotinylierte Peptide, deren Aminosäuresequenzen dem Epitop des zu reinigenden Antikörpers entsprechen (Tab. 6), werden in PBS gelöst (100 µg/ml). 1 ml IgG-Präparat wird mit 100 µl Peptidlösung gemischt und für eine Stunde bei 4°C inkubiert. In einem 2 ml-Reaktionsgefäß werden 150 µl Streptavidin-konjugierte Magnetobeads mit 1 ml PBS versetzt und gut vermischt. Mit Hilfe einer speziellen Halterung für die Reaktionsgefäße mit verschiebbarer Magnetrückwand (Dynal MPC®-S) werden die Beads fixiert und der Überstand wird abpipettiert. Dieser Waschvorgang wird 2-mal wiederholt. Zu den Beads wird

2. Material und Methoden

nun das mit dem Peptid vorinkubierte IgG-Präparat gegeben, die Suspension wird gut vermischt und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Streptavidin-konjugierten Magnetobeads binden an das biotinylierte Peptid. Mit der Magnetrückwand werden die Beads mit den daran gekoppelten Antikörpern fixiert. Der Überstand wird abgenommen. Die Beads werden 6-mal mit PBS gewaschen. Die Elution der Antikörper erfolgt mit 400 µl einer 3 M KSCN-Lösung unter mehrmaligem Schwenken für 5 min. Dann werden 400 µl 6 M KSCN zugefügt und ebenfalls für 5 min inkubiert. Nach Zugabe von 400 µl PBS erfolgt eine weitere Inkubation für 5 min. Dieses Gemisch wird in BSA-blockierte (1 mg BSA/3 ml PBS) Dialyse-Gefäße gefüllt und für 2-3 Tage bei 4°C ohne Rühren dialysiert. Dabei wird der PBS-Dialysepuffer täglich 2-mal gewechselt. Zur Konzentrationsbestimmung wird die Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen.

Tab. 6: Peptidsequenzen für die affinitätschromatografische Reinigung von Autoantikörpern

affinitätschromatografische Reinigung von	Peptidsequenz
PAR-Autoantikörper	LNITTCHDVL (aus Loop II von PAR1 und PAR2)
ET(A)-Autoantikörper	MLNATSKFMEFY [aus Loop II von ET(A)]

2.2.3 Kultur von Ventrikel-Kardiomyozyten neonataler Ratten

Neugeborene Ratten (1-3 Tage alt) werden in Gruppen von 5 bis 10 Tieren dekapitiert. Alle weiteren Schritte erfolgen unter sterilen Bedingungen. Mit Zellstoff und 70 % Ethanol wird der Brustkorb desinfiziert und anschließend mit einer Schere geöffnet. Das Herz wird mit zwei Skalpelln entnommen und in eine Petrischale mit PBS und Antibiotikum überführt. Nach der Entfernung der Atrien werden die Ventrikel mit dem Skalpell in 4-6 Stücke zerkleinert. Die Lösung mit den Ventrikelstücken wird in einen Erlenmeyerkolben pipettiert. Nach Absetzen der Stücke wird die PBS-Antibiotikum-Lösung abpipettiert und durch 10 ml frische Lösung ersetzt. Nach Schwenken und Absetzenlassen der Ventrikelstücken wird der Überstand wiederum entfernt. Nun erfolgt dieser Waschvorgang mit 10 ml PBS ohne Antibiotikum.

Zu Beginn der Trypsinierung werden die Ventrikelstücken in 15 ml 0,2 % Trypsinlösung im 37°C-Wasserbad für ca. 3 min unter Rühren inkubiert. Der Überstand wird abgesaugt und verworfen. Danach erfolgt die Isolierung der Kardiomyozyten. Für die erste Hauptfraktion werden die Ventrikelstücken in 30 ml Trypsinlösung im Wasserbad für 20 min inkubiert. Die Trypsinierung wird mit 10 ml eiskühlem NKS abgestoppt. Die Zellsuspension wird in ein 50 ml-Röhrchen überführt und bei 130×g für 6 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 10 ml SM20-I/50 % NKS aufgenommen. Dieser Vorgang wird für die zweite und gegebenenfalls für die dritte Hauptfraktion wiederholt. Die Fraktionen werden in einem 50 ml-Röhrchen vereint und erneut zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstands wird das Zellpellet in 20 ml SM20-I-Medium aufgenommen. Nach Vermischen von 100 µl Zellsuspension mit 100 µl Trypanblaulösung werden Zellzahl und -vitalität mit einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer bestimmt. Pro Herz werden 1-2 Millionen Kardiomyozyten gewonnen. Zur Zellsuspension werden NKS (10 %), Glutamin (2 mM), FUDR (2 µM) und SM20-I zugesetzt, so dass 2 Millionen Zellen in 3 ml Medium vorliegen. In 12,5 cm²-Kulturflaschen werden 3 ml Zellsuspension eingesät und die Flaschen werden mit einem Gummistopfen verschlossen. In einem 37°C-Brutschrank werden die Zellen kultiviert. Das Medium wird am Tag nach der Isolierung und dann jeden dritten Tag gewechselt.

2.2.4 Kultur von glatten Muskelzellen humaner Coronararterien (hCASMCM)

Zur Lagerung werden 500.000 Zellen pro Milliliter in SmGM-2-Medium mit 10 % FCS und 10 % DMSO aufgenommen und in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Für die Kultur werden pro 25 cm²-Kulturflasche 90.000 Zellen in 5 ml SmGM-2-Medium (5 % FCS) eingesät. Die Zellen werden im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Der erste Mediumwechsel erfolgt am nächsten Tag, weitere Wechsel alle zwei bis drei Tage. Bei 70-90 % Konfluenz werden die Zellen unter Verwendung von TV-Lösung passagiert oder in Passagen 7 bis 10 für eine Stimulation verwendet.

2.2.5 Blutentnahme

Für die Versuche mit Thrombozyten und Monozyten wird Blut gesunder Spender aus den Blutspendezentren der Charité und von HAEMA (Marzahn) in Berlin verwendet. Mit mündlicher Einwilligung der diensthabenden Ärzte und schriftlicher Einwilligung der Spender wird zu Beginn der Spende im Zuge der Abfüllung von Röhrchen für die routinemäßigen Laboruntersuchungen zusätzliches Blut entnommen. Dieses wird gut verpackt umgehend zum Labor transportiert und sofort entsprechend den Versuchen aufbereitet.

2.2.6 Monozytenisolierung aus humanem Vollblut

Es wird unter sterilen Bedingungen gearbeitet.

Für die Blutentnahme von einem Plasmaspender werden zwei 60 ml-Spritzen mit je 20 ml Heparin (10.000 IE) in physiologischer Kochsalzlösung gefüllt. Die Spritzen werden mit Blut auf 50 ml aufgefüllt, geschwenkt und in Styropor verpackt zum Labor transportiert.

In vier Leucosep-Röhrchen werden je 15 ml Ficoll-PaqueTM Plus gegeben. Die Röhrchen werden 1 min bei 800×g zentrifugiert. Nun wird das Blut auf die Röhrchen verteilt und 10 min bei 1.000×g ohne Bremse zentrifugiert. Das Plasma wird mit einer Pipette abgesaugt. Die Buffy Coats (Lymphozyten und PBMCs) aus zwei Leucosep-Röhrchen werden in ein 50 ml-Röhrchen abgegossen.

Ab jetzt wird mit eiskühlem PBS-HSA 0,1 % gearbeitet und Zentrifugations- und Inkubationsschritte erfolgen bei 4°C.

Mit PBS-HSA 0,1 % werden die zwei Röhrchen mit Buffy Coat auf jeweils 40 ml aufgefüllt. Nach Zentrifugation für 10 min bei 250×g wird der Überstand abpipettiert. Das Zellpellet wird in 1 ml PBS-HSA 0,1 % resuspendiert und auf 30 ml aufgefüllt. Die Zellzahl wird bestimmt und die Zellsuspension erneut für 10 min bei 250×g zentrifugiert. Der Überstand wird abpipettiert und das Zellpellet in 200 µl PBS-HSA 0,1 % pro 1×10⁷ Zellen aufgenommen. Es folgt eine Inkubation mit 20 µl Blocking- und 20 µl Antikörper-Lösung (monoklonale Mausantikörper spezifisch für T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen, Erythrozyten und Granulozyten) pro 1×10⁷ Zellen für 10 min auf dem Rollinkubator.

2. Material und Methoden

Während dieser Zeit werden 100 µl Magnetobeads (besetzt mit Anti-Maus-Antikörpern) pro 1×10^7 Zellen in einem Glasröhrchen gewaschen. Dazu wird dieses für 1 min in den Magnetpartikelkonzentrator gestellt. Der Überstand wird abpipettiert und die Beads werden in 2 ml PBS-HSA 0,1 % aufgenommen. Mit dem Magnetpartikelkonzentrator werden die Beads erneut von der Flüssigkeit getrennt. Danach werden die Beads im Ausgangsvolumen PBS-HSA 0,1 % aufgenommen und auf Eis gelagert.

Nach der Inkubation mit den Antikörpern werden die Zellen gewaschen. Dazu wird zu der Zellsuspension pro $1-5 \times 10^7$ Zellen 1 ml PBS-HSA 0,1 % hinzugegeben. Es folgt eine Zentrifugation für 10 min bei $250 \times g$. Der Überstand wird abpipettiert und die Zellen werden in 0,9 ml PBS-HSA 0,1 % pro 1×10^7 Zellen resuspendiert.

Danach erfolgen die Zugabe der Magnetobeads und eine Inkubation für 15 min auf dem Rollinkubator. Danach wird pro 1×10^7 Zellen 1 ml PBS-HSA 0,1 % hinzupipettiert. Die Suspension wird auf Glasröhrchen verteilt und diese werden jeweils für 2 min in den Magnetpartikelkonzentrator gestellt. Dabei werden die an die Magnetobeads gebundenen Zellen abgetrennt. Die Monozyten-Suspension wird dann in ein 50 ml-Röhrchen überführt. Die Zellzahl und Vitalität werden bestimmt.

Nach einer Zentrifugation für 10 min bei $250 \times g$ und Entfernen des Überstandes werden die Monozyten in auf 37°C erwärmtem RPMI-Medium aufgenommen (1×10^6 Monozyten/ml). Die Zellsuspension wird auf 25 cm^2 -KF verteilt und bis zur Stimulation 30 min im Brutschrank (37°C , 5 % CO_2) inkubiert.

2.2.7 Bestimmung von Zellzahl und –vitalität

Zum Zählen von Thrombozyten wird die Suspension zunächst 1:100 mit 0,9 % NaCl-Lösung in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß verdünnt. Die Zählung der Zellen erfolgt mit einer Neubauer-Zählkammer. Am Mikroskop werden fünf diagonale Kleinquadrate zu je 16 Kleinstquadraten ausgezählt. Die Summe multipliziert mit 5.000 ergibt die Thrombozytenzahl in der Suspension pro Mikroliter.

Bei allen anderen Zelltypen werden in einem 500 µl-Reaktionsgefäß 10 µl Zellsuspension mit 10 µl Trypanblaulösung gemischt. Die Zählung erfolgt ebenfalls mit einer Neubauer-Zählkammer. Nach Auszählung der lebenden und blau angefärbten toten Zellen in den vier Eckquadraten zu je 16 Kleinquadraten können Zellzahl und –vitalität berechnet werden. Die Summe wird dazu verdoppelt und mit dem Faktor 0,4 multipliziert. Das Ergebnis ist die Zellzahl in der Ausgangssuspension pro Mikroliter.

2.2.8 Stimulation von Zellen

Alle Untersuchungen erfolgen unter sterilen Bedingungen.

Frisch isolierte Monozyten werden nach einer 30-minütigen Ruhephase im Brutschrank stimuliert.

Bei adhärennten Zellen in Kultur wird einen Tag vor der Stimulation das Medium gewechselt. Dazu werden Medien und ggf. PBS auf 37°C erwärmt. Nach dem Abpipettieren des Mediums werden die Zellen mit 2 ml (12,5 cm² KF) bzw. 4 ml (25 cm² KF) frischem Medium versetzt.

Bei Stimulationen unter serumfreien Bedingungen werden die Zellen nach Entfernen des serumhaltigen Mediums zwei Mal mit 2 ml (12,5 cm² KF) bzw. 4 ml (25 cm² KF) PBS gespült. Danach werden 2 ml (12,5 cm² KF) bzw. 4 ml (25 cm² KF) serumfreies Medium in die Flaschen pipettiert. Bis zur Stimulation werden die Zellen weiter im Brutschrank kultiviert.

Stimulanzen und gegebenenfalls Blocker werden mit A. dest. (Aqua ad iniectabilia) so verdünnt, dass sie im Volumenverhältnis 1:100 ins Zellmedium pipettiert werden können. Als Negativkontrolle wird A. dest. verwendet. Die Inkubation erfolgt unter normalen Kultivierungsbedingungen (im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂, bei Kardiomyozyten ohne CO₂-Einstellung).

Antagonisten werden 30 min vor Beginn der Stimulation zu den Zellen gegeben.

2.2.9 Bestimmung der Pulsationsrate von Kardiomyozyten

Neonatale Ratten-Kardiomyozyten werden am 3. oder 4. Tag der Kultivierung verwendet. Das Medium SM20-I mit 10 % NKS sowie der Objektisch des Mikroskops werden auf 37°C erwärmt. Für eine Stunde werden die spontan pulsierenden Kardiomyozyten mit 2 ml frischem Medium im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Mit Hilfe einer gelöcherten Metallschablone auf dem Objektisch werden zehn Messfelder mit synchron kontrahierenden Zellaggregaten ausgewählt. Die computergestützte Messung erfolgt über das Programm Imagoquant Fourieranalyse 100. Zunächst wird die basale Pulsationsrate der Zellen in den festgelegten Messfeldern ermittelt. Nach einer Inkubation mit dem Antikörper-Präparat (1:40, bei affinitätschromatografisch gereinigten Antikörpern 1:100) für eine Stunde bei 37°C folgt eine erneute Bestimmung der Pulsationsrate. Die Differenz aus beiden Bestimmungen wird in Schläge/min angegeben. Der ermittelte „cut off“-Wert liegt bei 7,2. Alle Antikörper-Präparate, bei denen die Differenz der Pulsationsraten größer als der „cut off“-Wert ist, werden als Autoantikörper-positiv bewertet.

2.2.10 Herstellen eines Zellextrakts

Die Zellkulturflaschen, die Reaktionsgefäße, die D-PBS-Lösung und der Lysispuffer werden stets in Eis gekühlt. Das Medium wird aus der KF abgegossen. Die Flasche wird zwei Mal mit 2 ml (12,5 cm² KF) bzw. 4 ml (25 cm² KF) D-PBS gespült. Nach dem Abgießen wird das verbliebene D-PBS sorgfältig abpipettiert. Die Zellen werden in 50 µl Lysispuffer lysiert und mit einem Zellschaber vom Flaschenboden gelöst. Das Lysat wird in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert und 10 min inkubiert. Nach einer kurzen Durchmischung (Vortex) erfolgt eine Zentrifugation bei 16.000×g bei 4°C für 10 min. Ungelöste Zellbestandteile bilden ein Pellet. Der Überstand wird abpipettiert und in ein 0,5 µl-Reaktionsgefäß überführt. Der Zellextrakt wird bei -80°C gelagert.

2. Material und Methoden

2.2.11 Proteinbestimmung nach Lowry

In einem 0,5 ml-Reaktionsgefäß werden 4 µl Zellextrakt mit 16 µl Lysispuffer verdünnt (1:5). Dann werden 140 µl A. dest. zugegeben. Nach dem Vermischen werden davon dreifach 40 µl in eine 96-Well-Platte pipettiert.

Für die Eichreihe werden BSA-Standard (0,2 mg/ml), Lysispuffer und A. dest. dreifach nach folgendem Schema in die Platte pipettiert: BSA-Standard 2,5 µl bis 20,0 µl (entspricht 0,5 µg bis 4,0 µg), 5 µl Lysispuffer und mit A. dest. jeweils auf 40 µl auffüllen.

Pro 1 ml Lösung A werden 20 µl Lösung S des Bio-Rad-Proteinbestimmungskits in einem Reaktionsgefäß vermischt. Von diesem Gemisch werden 25 µl pro Well hinzupipettiert. Anschließend werden 200 µl Lösung B des Kits zugegeben. Es folgt eine Inkubation auf dem Mikrotiterplatten-Schüttler für 15 min. Die Platte wird im Mikroplatten-Absorptionsfotometer bei einer Wellenlänge von 650 nm gemessen.

2.2.12 Western-Blot

2.2.12.1 Prinzip des Western-Blots

Mit „blotten“ (engl.: to blot = klecksen) wird die Übertragung bestimmter Substanzen auf eine Membran bezeichnet. Im Western-Blot sind diese Substanzen Proteine. Fixiert auf der Membran können die Proteine detektiert und quantifiziert werden.

Zuvor wird ein Proteingemisch, z.B. ein Zellextrakt, mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Dabei bewegen sich in einem elektrischen Feld kleine Proteine schnell und große Proteine langsam durch ein polymeres Netzwerk. Bei der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) werden Acrylamid- und Bisacrylamidmonomere durch die Katalyse von TEMED (N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin) und Ammoniumpersulfat vernetzt. SDS (Natriumdodecylsulfat) ist negativ geladen und überdeckt bei der Anlagerung an die Proteine deren Eigenladung. Somit beeinflusst diese nicht den Lauf der Proteine im elektrischen Feld und alle Proteine bewegen sich entsprechend ihrer Molekularmasse in Richtung Anode. Bei der diskontinuierlichen Gelelektrophorese werden die Proteine zunächst in einem Sammelgel zu einer scharfen Bande fokussiert. Danach werden die Proteine im Trenngel der Größe nach aufgetrennt.

Beim Wet-Blot-Verfahren wird der gesamte Komplex aus Gel, anliegender Membran und fixierendem Filterpapier und Schwämmen eingeklemmt in einer Kunststoffkassette vollständig in Transferpuffer getaucht. Wieder bewegen sich die Proteine im elektrischen Feld in Richtung Anode, und zwar aus dem Gel auf die Membran.

Beim sogenannten Immunoblot wird für die Proteindetektion ein Antikörper verwendet, der spezifisch gegen ein Epitop eines Proteins gerichtet ist. Dieser Primärantikörper wird wiederum mit einem Sekundärantikörper detektiert, welcher mit einem Enzym markiert ist. Durch die Reaktion mit dem passenden Substrat entsteht ein direkt nachweisbares Produkt.

Bei der ECL (engl. *enhanced chemiluminescence*, verstärkte Lumineszenz)-Reaktion wird ein Meerrettich-Peroxidase-gekoppelter Sekundärantikörper verwendet. Das Enzym katalysiert die Oxidation des Substrats Luminol in Gegenwart von Wasserstoffperoxid (H_2O_2). Luminol wird dadurch in einen angeregten Zustand versetzt. Bei der Umkehr in den Grundzustand wird Licht emittiert. Diese Lichtemission wird verstärkt und kann mit einem radiografischen Film detektiert werden.

2.2.12.2 Herstellung des SDS-Polyacrylamid-Gels

Zum Gießen des Gels werden zwei Glasplatten nach Anleitung des Herstellers der Elektrophorese-Kammer in einer Halterung fixiert. Die Geldicke beträgt 1,5 mm. Zunächst wird das Trenngel (10 % Acrylamid) zwischen die zwei Glasplatten der Kammer pipettiert und mit A. dest. überschichtet. Das Gel polymerisiert 1 h lang aus. Danach wird das A. dest. abgegossen und das Sammelgel (5 % Acrylamid) auf das Trenngel pipettiert. Nach Einsetzen des Kammes für die Geltaschen polymerisiert das Gel wieder 1 h lang aus.

2.2.12.3 Vorbereitung der Proben

In einem 0,5 ml-Reaktionsgefäß wird der Zellextrakt im Verhältnis 3:1 mit Probenpuffer (4-fach konzentriert) versetzt. Dieses Gemisch wird im Thermoschüttler bei 800 rpm für 5 min auf 95°C erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird kondensierte Flüssigkeit kurz mittels Tischzentrifuge herunterzentrifugiert.

2.2.12.4 Gelelektrophorese

Nach Anleitung des Herstellers werden zwei Gele pro Kammer eingesetzt und diese wird in Eis gestellt. Die Kammer wird gefüllt mit auf 4°C gekühltem Elektrophoresepuffer. Die Kämme werden vorsichtig entfernt und die Geltaschen mittels einer Pasteurpipette mit dem Puffer ausgespült. In einer Tasche werden 4 µl des Molekulargewichtsmarkers aufgetragen. Von den Proben werden je nach Verfügbarkeit 10 oder 20 µg aufgetragen.

Bei konstanter Spannung erfolgt der Lauf zunächst für 15 min bei 50 V. Danach werden die Proteine für 100 min bei 120 V der Größe nach getrennt.

2.2.12.5 Wet-Blot-Verfahren

Die Nitrocellulose-Membran (9,0×6,0 cm) wird für mindestens 10 min in A. dest. inkubiert. Danach werden Membran, Filterpapier, Schwämme und das Gel mit den aufgetrennten Proteinen in auf 4°C gekühltem Blot-Puffer getränkt. Die Blot-Kammer wird nach Anleitung des Herstellers zusammengesetzt. Dabei werden Luftblasen zwischen Membran und Gel durch Rollen eines Glasstabes entfernt. Die Kammer wird in Eis gestellt. Bei konstanter Stromstärke (250 mA) erfolgt für 120 min der Transfer der Proteine auf die Membran.

2.2.12.6 Proteindetektion

2. Material und Methoden

Um unspezifische Proteinbindungsstellen der Nitrozellulose-Membran zu blockieren wird die Membran für 1 h mit einer Lösung aus 5 % Magermilchpulver in TBST auf einem Taumelschüttler inkubiert.

Die Inkubation der Membran mit dem Primärantikörper in Blocking-Lösung erfolgt über Nacht bei 4°C in einem 50 ml-Röhrchen auf dem Rollinkubator. Danach wird die Membran in einer Plastischale dreimal kurz mit TBST gewaschen, dann einmal 15 min und weitere zweimal 5 min auf dem Taumelschüttler, jedes Mal mit frischem TBST. Danach erfolgt die Inkubation der Membran mit dem Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper in 30 ml TBST für 1 h auf dem Taumelschüttler. Die Membran wird erneut mit TBST gewaschen, dreimal kurz, einmal 15 min und viermal 5 min.

Die Membran wird kurz auf Papiertüchern abgetropft und in einer Petrischale mit 1,5 ml ECL-Lösung 1 min inkubiert. Das Substrat in dieser Lösung startet eine chemilumineszente Reaktion mit der Peroxidase. Ein Röntgenfilm wird mit der in einer Klarsichtfolie verpackten Membran in einer Fotokassette in der Dunkelkammer belichtet. Die Belichtungszeit beträgt je nach Intensität des Lumineszenzsignals 10 s bis zu 1 h. Mit der Entwicklungsmaschine wird der Röntgenfilm entwickelt. Die Quantifizierung der Intensität der Proteinbanden erfolgt am Computer mit dem Programm Quantity One.

Ein Nachweis über das Auftragen gleicher Proteinmengen erfolgt durch das Anfärben der Proteine auf der Membran mit Ponceau-S-Lösung. Abb. 4 zeigt ein Beispiel einer solchen Membran.

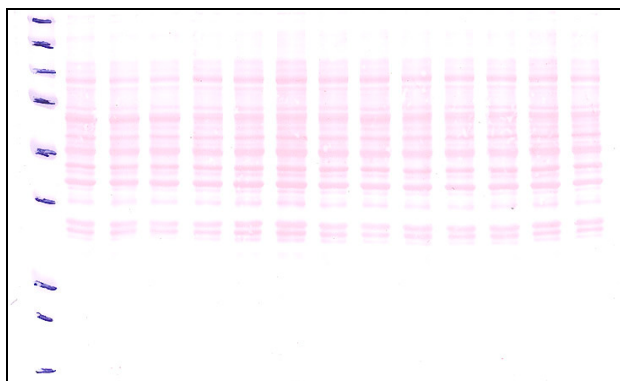


Abb. 4: Ponceau-S-Färbung der Proteine auf einer Western-Blot-Membran zum Nachweis gleicher Proteinmengen

2.2.13 Messung der Produktion von Sauerstoffradikalen

2.2.13.1 Prinzip der Messung von Sauerstoffradikalen mit MCLA

Luminophore sind Stoffe, die Energie aus chemischen Reaktionen in Form von Lichtenergie emittieren. Dieser Vorgang heißt Chemilumineszenz. Der Luminophor MCLA produziert Chemilumineszenz in Gegenwart von Superoxidanionen.

2.2.13.2 Durchführung der Messung produzierter Sauerstoffradikale

Bei Untersuchungen mit Antikörper-Präparationen (IgG) werden diese im Verhältnis 1:20 zur fertigen Monozytensuspension (3 Mio. Zellen/ml) und als Kontrolle zum Medium zugegeben. Davon werden 100 µl in die Wells einer weißen 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert. Die Platte wird im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert – 30 min lang bei Versuchen ohne IgG, 60 min bei Versuchen mit IgG.

PMA wird als 80 µM-Aliquot (gelöst in DMSO) bei –20°C gelagert. Mit Medium werden Verdünnungen hergestellt, die die 4-fache Endkonzentration haben. Für die Kontrolle ohne PMA wird DMSO genauso verdünnt wie die höchste zu verwendende PMA-Konzentration. Davon werden 50 µl zu den Monozyten in die Platte pipettiert.

Der Lumineszenzfarbstoff MCLA wird als 10 mM-Aliquot (gelöst in A. dest.) in lichtundurchlässigen Reaktionsgefäßen bei –20°C gelagert. In lichtgeschützten Röhrchen werden auch hiervon mit Medium Verdünnungen hergestellt, die die 4-fache Endkonzentration haben. 50 µl werden in die Wells pipettiert und die Platte wird sofort in den Fluoroskan eingelegt.

Die Messung der Emission erfolgt bei der Wellenlänge 546 nm. Jedes Well wird 1 s lang gemessen, die gesamte Platte 40-mal (entspricht 70 min).

2.2.14 FACS-Messung

2.2.14.1 Prinzip einer FACS-Messung

Bei einer durchflussscytometrischen Messung werden Zellen in Form eines laminaren Probenstroms durch eine Messküvette geleitet. Das auftreffende monochromatische Licht eines Lasers wird von jeder einzelnen Zelle gestreut und reflektiert. Außerdem können Zellen spezifisch detektiert werden mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern, welche Licht emittieren. Über verschiedene Spiegel und Filter wird die von der Zelle abgehende Strahlung nach Wellenlängen getrennt und von Detektoren registriert. Das Vorwärtsstreulicht („*forward scatter*“) ist ein Maß für die Größe der Zelle, während das Seitwärtsstreulicht („*side scatter*“) ein Maß für die Zellgranularität ist. Mit diesen Informationen lassen sich die Zellen in der Probe charakterisieren.

2. Material und Methoden

2.2.14.2 Bestimmung der Reinheit einer Monozytenpräparation

Sieben 1,5 ml-Reaktionsgefäße mit je 500 µl Monozytensuspension (1×10^6 Zellen/ml) werden für 3 min bei $3.000 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wird abpipettiert und das Zellpellet in 100 µl FACS-Puffer resuspendiert. Antikörper werden nach folgendem Schema zugesetzt:

1. ohne Antikörper
2. Maus-IgG_{2a}-Isotypkontrolle, PE-konjugiert (3 µl)
3. Maus-IgG_{2a}-Isotypkontrolle, FITC-konjugiert (5 µl)
4. Maus-IgG_{2a}-Isotypkontrolle, PE-konjugiert (3 µl) und Maus-IgG_{2a}-Isotypkontrolle, FITC-konjugiert (5 µl)
5. Maus-anti-human-HLA-DR, PE-konjugiert (3 µl)
6. Maus-anti-human-CD14, FITC-konjugiert (5 µl)
7. Maus-anti-human-HLA-DR, PE-konjugiert (3 µl) und Maus-anti-human-CD14, FITC-konjugiert (5 µl)

Es folgt eine Inkubation für 30 min bei 4°C. Anschließend werden die Zellen zweimal durch Zentrifugation bei $3.000 \times g$ für 3 min und Resuspendieren in 500 µl FACS-Puffer gewaschen. Die Zellsuspension wird in ein Röhrchen überführt und am FACS-Gerät gemessen.

2.2.15 Thrombozyten-Aggregometrie

2.2.15.1 Prinzip der Aggregometrie

Bei der Aggregometrie wird die Veränderung der Lichtdurchlässigkeit einer Thrombozytensuspension gemessen. Einer Transmission von 0 % entspricht eine Suspension mit vollständig vereinzelt vorliegenden Thrombozyten. Hingegen nimmt die Transmission den Wert 100 % an, wenn die Messung ohne Thrombozyten durchgeführt wird. Diese Grenzwerte werden für jede Blutprobe individuell eingestellt durch Eichung des Aggregometers mit PRP (plättchenreiches Plasma) oder Thrombozyten-Suspension (0 %) bzw. mit PPP (plättchenarmes Plasma) oder Suspensionspuffer (100 %).

Durch Stimulanzen wie Kollagen und ADP aggregieren Thrombozyten. Zur gleichmäßigen Durchmischung der Flüssigkeit rotiert ein Stahlstäbchen in der Messküvette. Eine Aggregation bewirkt eine zunehmende Transmission der Thrombozytensuspension.

2.2.15.2 Aufbereitung gewaschener Thrombozyten

Alle Puffer werden frisch angesetzt. Die Apyrase (1 U/µl in 0,9 % NaCl) und das Prostaglandin (PGE₁, 10 µM in 0,9 % NaCl) werden auf Eis gelagert. Zur Inkubation und Zentrifugation werden die Röhrchen mit Parafilm® verschlossen.

In ein 13 ml-Polystyrolröhrchen werden 1,6 ml ACD-A und 10 µl der PGE₁-Gebrauchslösung eingefüllt. Das Röhrchen wird mit Blut auf 10 ml aufgefüllt und vorsichtig gemischt. Es folgt eine Ruheinkubation für 30-60 min.

Durch Zentrifugation für 20 min bei 120×g (ohne Bremse) wird PRP gewonnen. In ein neues Polystyrolröhrchen werden 2 ml Waschpuffer, 20 µl PGE₁-Lösung, 10 µl Apyraselösung und 222 µl ACD-A vorgelegt. Dazu kommen 2 ml PRP. Es folgt eine Inkubation von 15 min. Das Thrombozytenpellet wird durch Zentrifugation für 10 min bei 1.200×g gewonnen. Nach dem Dekantieren des Überstandes wird das Pellet in 2 ml Waschpuffer, 60 µl PGE₁-Lösung und 20 µl Apyraselösung vorsichtig resuspendiert. Die Thrombozytensuspension wird auf 6 ml mit Waschpuffer aufgefüllt. Auf eine 15 minütige Inkubation folgt eine erneute Zentrifugation von 10 min bei 1.200×g. Der Überstand wird entfernt und das Pellet in 1 ml Waschpuffer resuspendiert. Eine Probe für die Zellzählung wird abgenommen.

Danach werden 60 µl PGE₁-Lösung und 5 ml Waschpuffer zu den Thrombozyten im Röhrchen gegeben. Nach einer Inkubation von 15 min folgt die Zentrifugation für 10 min bei 1.200×g. Der Überstand wird dekantiert und das Thrombozytenpellet in Tyrodepuffer resuspendiert (250.000 Thrombozyten/µl). Die fertige Thrombozytensuspension wird für 30 min im Wasserbad bei 37°C inkubiert.

2.2.15.3 Aufbereitung von PRP

Das in Citrat-Röhrchen abgenommene Blut wird umgefüllt in 13 ml-Polystyrolröhrchen und für 30 min stehen gelassen. Um für einen stabileren pH-Wert der Suspension zu sorgen wird vor dem Verschließen der Röhrchen mit Parafilm[®] CO₂-angereicherte Atemluft in die Röhrchen geblasen.

Für die Herstellung von PRP wird das Blut 20 min bei 120×g (ohne Bremse) zentrifugiert. Das PRP wird vorsichtig in ein neues Röhrchen abpipettiert. Zum Zählen der Thrombozyten wird eine Probe entnommen. Für 30 min wird das PRP im Wasserbad bei 37°C inkubiert.

Durch Zentrifugation der Blutröhrchen für 15 min bei 1.500×g (ohne Bremse) wird PPP erhalten. Dieses wird in ein neues Röhrchen überführt. Mit Hilfe des PPP wird die Thrombozytenzahl des PRP auf 250.000/µl eingestellt.

2.2.15.4 Durchführung der Aggregometrie

Nach dem Aufheizen des Inkubatorblocks des Aggregometers auf 37°C werden in die silikonisierten Glasküvetten 500 µl Tyrodepuffer bzw. PPP eingefüllt und der 100 %-Transmissionswert bestimmt. Dann erfolgt durch 450 µl Thrombozytensuspension bzw. PRP zusammen mit einem Magnetrührer die Bestimmung des 0 %-Transmissionswertes. Die gefüllten Küvetten werden für 10 min in den Inkubatorblock gestellt und mit Parafilm[®] abgedeckt.

Danach werden die Küvetten in die Messkanäle platziert und das Gerät wird geeicht. Zum Start der Aggregation werden 50 µl der Stimulanzien zur Thrombozytensuspension bzw. zum PRP hinzupipettiert. Die Lichttransmission wird 5 min lang aufgezeichnet.

Für die Stimulation der Aggregation werden Collagen und ADP in den vom Hersteller empfohlenen Konzentrationen eingesetzt (190 µg/ml bzw. 20 µM). Als Negativkontrolle dient 0,9 % NaCl.

2. Material und Methoden

2.2.16 Quantifizierung von Serotonin

2.2.16.1 Prinzip der Serotonin-Quantifizierung mittels HPLC

Mit der Chromatografie lassen sich verschiedenartige Moleküle eines Probengemisches auftrennen und analysieren. Das Probengemisch wird als mobile Phase über ein Material geleitet, das als stationäre Phase bezeichnet wird. Unterschiedliche Wechselwirkungen der Moleküle der mobilen Phase mit den Molekülen der stationären Phase bewirken entsprechend unterschiedliche Retentionszeiten, so dass die einzelnen Komponenten der Probe aufgetrennt werden. Die Retentionszeiten sowie die anschließende Detektion physikalischer oder chemischer Eigenschaften der Komponenten ermöglichen deren Identifizierung.

Bei der Flüssigkeitschromatografie ist die Probe in einem Lösemittel gelöst. Diese mobile Phase wird durch eine Säule geleitet, die die stationäre Phase enthält. Für die Elution kann ein geeignetes Lösemittel oder eine Reihe von Lösemitteln gewählt werden.

Die hohe Leistungsfähigkeit der HPLC beruht auf die Nutzung hocheffizienter Materialien für die stationäre Phase und deren geringe Teilchengröße sowie auf der Verbesserung der Geräte.

Für die Serotonin-Bestimmung in Proben der Thrombozyten-Aggregometrie wird eine C-18-Umkehrphase-Säule verwendet. C-18-Alkylgruppen sind an der Oberfläche von Kieselgelteilchen gebunden. Umkehrphase (RP, engl. *reverse phase*) bedeutet, dass die Polarität der stationären Phase geringer ist als die der mobilen Phase. Ein Fluoreszenzdetektor misst die Emission von Licht der Wellenlänge 345 nm bei einer Exzitation der Wellenlänge 295 nm.

2.2.16.2 Probenvorbereitung nach Aggregometrie

Sofort nach der Aggregometrie werden die Küvetten in Eis gepackt und gegebenenfalls mit Aluminiumfolie vor Licht geschützt. Der Rührmagnet wird aus der Küvette entfernt und die Thrombozyten-Suspension in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Es erfolgt eine Zentrifugation bei $16.000 \times g$ bei 4°C für 10 min. Der Überstand sowie die restliche, für die Aggregometrie nicht verwendete Thrombozyten-Suspension werden unter Dokumentation des Volumens jeweils in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Pro 100 μl Probe werden 4 μl 70 % Perchlorsäure zugesetzt. Die Reaktionsgefäße mit der Thrombozyten-Suspension werden 3×20 s bei 4°C mit Ultraschall lysiert. Im Intervall werden die Proben kurz anzentrifugiert. Nach der Ultraschallbehandlung werden diese Proben bei $16.000 \times g$ bei 4°C für 20 min zentrifugiert und anschließend für 15 s mit dem Vortex-Gerät durchmischt. In Eis gestellt setzt sich das Zellpellet ab und der Überstand kann in ein neues Reaktionsgefäß überführt und gegebenenfalls bei -80°C aufbewahrt werden. Für die Messung an der HPLC-Anlage werden 75 μl Probe in ein HPLC-Messgefäß pipettiert.

2.2.16.3 Messung an der HPLC-Anlage

Die Proben werden auf $2-4^{\circ}\text{C}$ gekühlt. Für den Probenfluss im System wird HPLC-Puffer (10 mM KH_2PO_4 , 5 % Methanol) verwendet. 70 μl der Probe werden in die Messsäule

injiziert. Die Auswertung erfolgt mit dem Programm CLASS-LC10. Das AUC des entsprechenden Peaks gilt als Maß für die Serotonin-Menge.

2.2.17 Statistische Auswertung

Soweit nicht anders erwähnt sind in Text und Grafen Mittelwerte \pm SEM angegeben. Die Zahl der Stichproben n ist den Abbildungsbeschriftungen zu entnehmen. Bei genügend hoher Stichprobenanzahl und positiver Testung auf Normalverteilung wird der T-Test für ungepaarte Stichproben verwendet. Sind die Voraussetzungen für die Verwendung des T-Tests nicht gegeben, erfolgt die Ermittlung signifikanter Unterschiede mit dem nichtparametrischen Test nach Mann-Whitney. Beim Vergleich von Stichprobenwerten mit einem bestimmten Wert, z.B. mit dem Kontrollwert=1, wird der Wilcoxon-Rang-Test verwendet. Die Irrtumswahrscheinlichkeit α ist 0,05. Alle Grafen und statistischen Berechnungen sind mit dem Programm Prism[®] 4 erstellt.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung von Autoantikörpern gegen Protease-aktivierte Rezeptoren 1 und 2 und gegen den Endothelin-Rezeptor ET(A)

3.1.1 Änderung der Pulsationsrate von Kardiomyozyten durch Thrombin, das Peptid SFLLRN und Endothelin-1

Die Änderungen der Schlagfrequenz spontan pulsierender Kardiomyozyten in Abhängigkeit der Konzentration von Thrombin, dem PAR1/2-aktivierenden Peptid SFLLRN und Endothelin-1 (ET-1) wurden bestimmt (Abb. 5). Nach Ermittlung der basalen Pulsationsrate wurden die Zellen für 5 min mit den Stimulanzen inkubiert. Thrombin und SFLLRN erhöhten die Pulsationsraten dosisabhängig. Die Maximalantwort auf Thrombin wurde bei einer Konzentration von 1 E/ml und auf das Peptid bei 100 µM ermittelt. ET-1 induzierte einen dosisabhängigen, negativ chronotropen Effekt. Die maximale Antwort wurde bei einer Endothelin-1-Konzentration von 100 nM ermittelt.

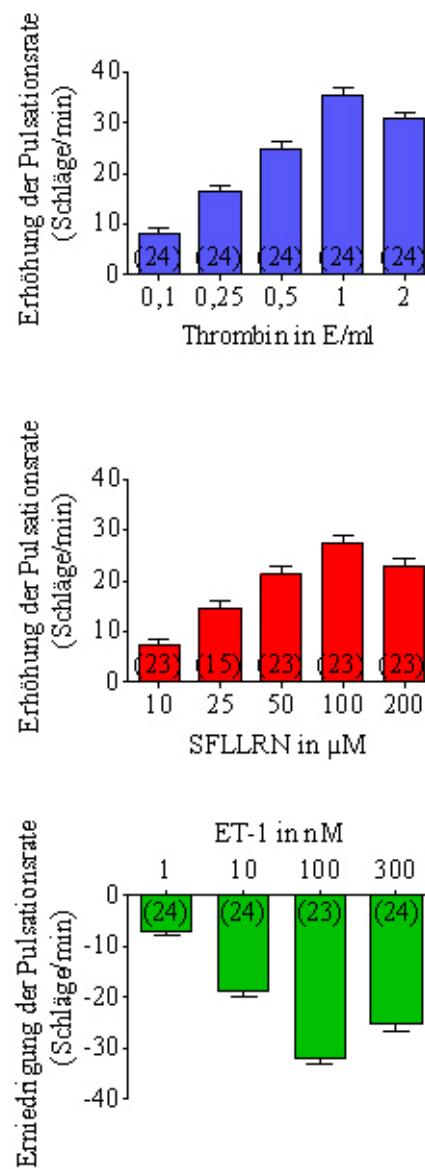


Abb. 5: Änderung der Pulsationsrate von Kardiomyozyten nach Stimulation mit Thrombin, SFLLRN oder ET-1.

3. Ergebnisse

Die Effekte von Thrombin (1 E/ml) und dem Peptid SFLLRN (100 μ M) wurden durch 15 min Vorinkubation mit dem inhibitorischen Peptid YFLLRN (1 μ g/ml) blockiert (Abb. 6). Der ET(A)-Antagonist BQ610 (1 μ M), nicht aber der ET(B)-Antagonist BQ788 (1 μ M) inhibierte nach 15-minütiger Vorinkubation die folgende Stimulation mit Endothelin-1 (ET-1, 100 nM). Diese Daten zeigen, dass Endothelin-1 die Pulsationsrate der Kardiomyozyten über den ET(A)-Rezeptor erniedrigte.

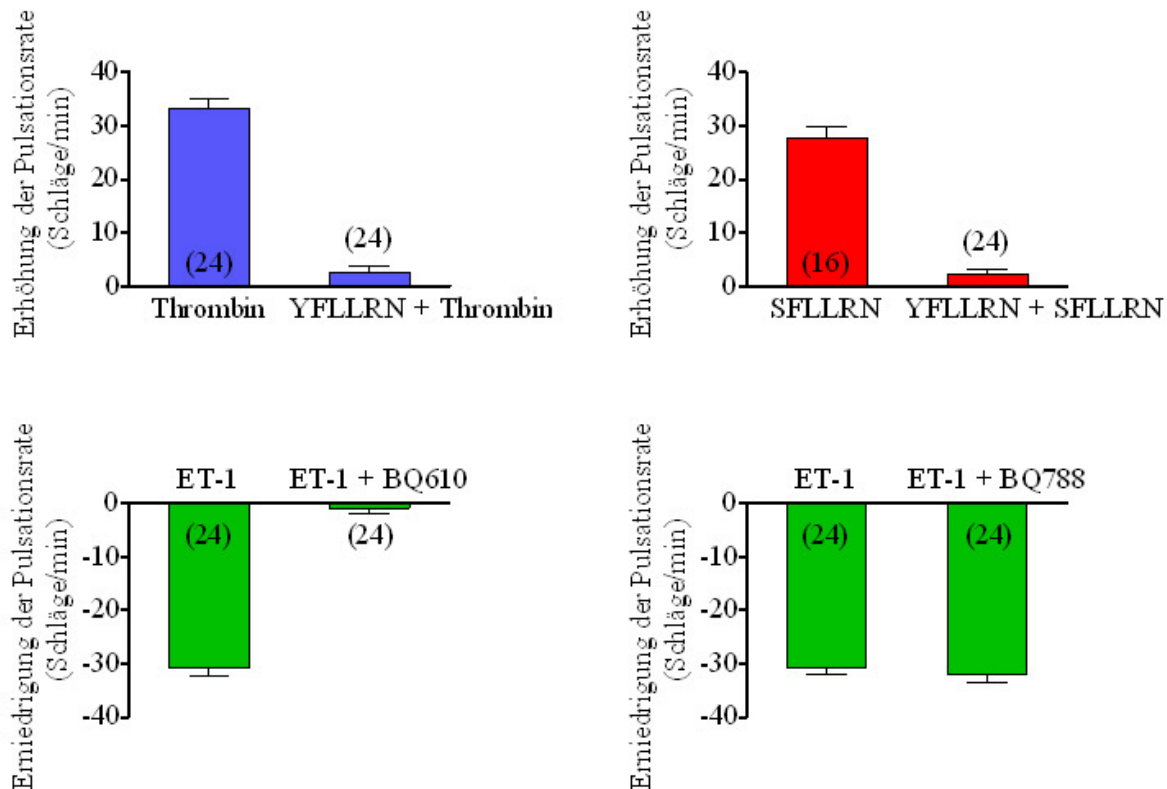


Abb. 6: Pulsationsraten nach Stimulation mit Thrombin, dem PAR1/2-aktivierenden Peptid SFLLRN oder Endothelin-1 und Antagonismus durch das PAR1-inhibitorische Peptid YFLLRN bzw. den ET(A)-Blocker BQ610 und den ET(B)-Blocker BQ788

Es wurde untersucht, ob und in welcher Zeit das inhibitorische Peptid YFLLRN (1 μ g/ml) das Rezeptor-eigene Peptid (nach Spaltung durch Thrombin) oder das synthetisch hergestellte, stimulatorische Peptid SFLLRN verdrängen kann [122]. Dazu wurde zunächst die Pulsationsrate nach 5 min Inkubation mit Thrombin bzw. SFLLRN bestimmt. Dann wurde YFLLRN zugegeben und nach weiteren 5, 15 und 30 min wurde wieder die Pulsationsrate ermittelt. Das Ergebnis ist in Abb. 7 dargestellt. Die zeitliche Abnahme der Pulsationsraten-Erhöhung spricht für eine Verdrängung des stimulatorischen Peptids durch das inhibitorische Peptid YFLLRN.

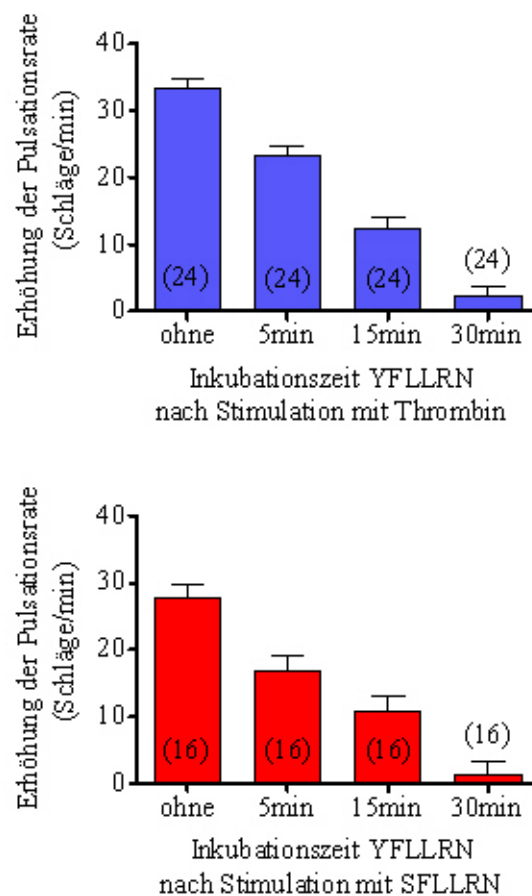


Abb. 7: Pulsationsrate bei Verdrängung des stimulatorischen Peptids SFLLRN durch das inhibitorische Peptid YFLLRN

3.1.2 Änderung der Pulsationsrate von Kardiomyozyten durch Autoantikörper gegen die Rezeptoren PAR und ET(A)

Seren von Patienten mit Raynaud-Syndrom oder anderen Herz-Kreislauf-Erkrankungen können sowohl PAR-Autoantikörper als auch ET(A)-Rezeptor-Autoantikörper enthalten. Der Nachweis und die Charakterisierung der Autoantikörper gegen die Rezeptoren PAR und ET(A) erfolgten über die In-vitro-Bestimmung der Pulsationsrate von Kardiomyozyten. Nach Ermittlung der basalen Pulsationsrate wurden die Zellen mit Patienten-IgG (1:20) inkubiert (Abb. 8). Die Pulsationsrate wurde erhöht. Wurde nun das PAR1-inhibitorische Peptid YFLLRN [122,123] (1 µg/ml) eingesetzt, so fiel die Pulsationsrate wieder zurück auf das Basalniveau oder darunter. Wurde im letzteren Fall auch der ET(A)-Blocker BQ610 [124] (1 µM) zugegeben, so wurde die Pulsationsrate wieder auf das Basalniveau angehoben. Die IgG-Präparate, dessen Pulsationsraten-erhöhender Effekt durch das Thrombin-Rezeptor-inhibitorische Peptid YFLLRN aufgehoben wurde, enthielten PAR-aktivierende Autoantikörper. Diese PAR-Autoantikörper erhöhten die Pulsationsrate der Kardiomyozyten um $22,2 \pm 1,6$ Schläge/min (Mittelwert \pm SEM). Die IgG-Präparate, bei denen die

3. Ergebnisse

Schlagfrequenz der Kardiomyozyten durch YFLLRN unter das Basalniveau fiel und dieser Effekt durch den ET(A)-Antagonisten BQ610 aufgehoben wurde, enthielten PAR- und ET(A)-aktivierende Autoantikörper. Diese Kombination von Autoantikörpern erhöhte die Pulsationsrate nur um $9,3 \pm 2,3$ Schläge/min.

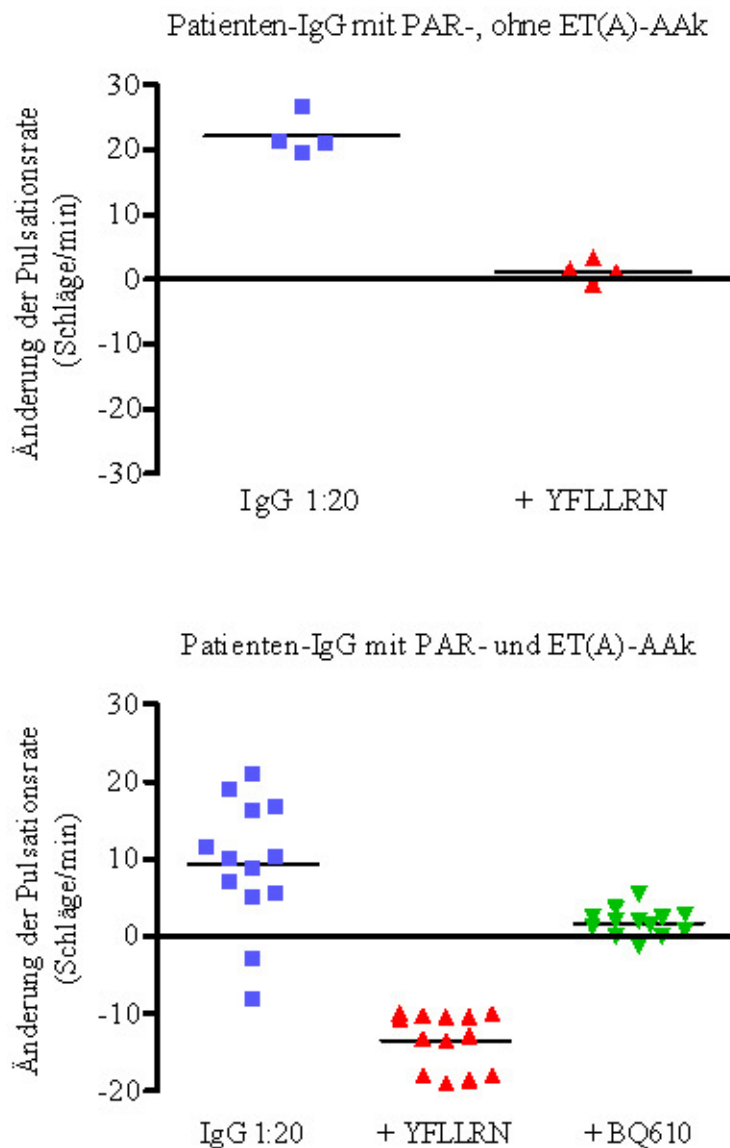


Abb. 8: Änderung der Pulsationsrate von Kardiomyozyten durch Patienten-IgG mit Autoantikörper gegen PAR und/oder ET(A). YFLLRN: Thrombin-Rezeptor-inhibitorisches Peptid, BQ610: ET(A)-Blocker

Die Funktionalität der Autoantikörper an den Rezeptoren PAR und ET(A) konnte durch ein weiteres Experiment mit den Antagonisten gegen PAR und ET(A) gezeigt werden (Abb. 9). Hier wurden die Kardiomyozyten nach Ermittlung der basalen Pulsationsrate entweder mit dem ET(A)-Rezeptorantagonisten BQ610 ($1 \mu\text{M}$) oder mit dem Thrombin-Rezeptor-inhibitorischen Peptid YFLLRN ($1 \mu\text{g/ml}$) für 30 min vorbehandelt. Die erneute Bestimmung

der Pulsationsrate ergab eine Erhöhung um $20,7 \pm 1,5$ Schläge/min (Mittelwert \pm SEM) bei Vorbehandlung mit BQ610. Da die Kombination von PAR- und ET(A)-Autoantikörpern im oben erläuterten Versuch (siehe Abb. 8) nur eine Erhöhung um $9,3 \pm 2,3$ Schläge/min ergab, kann von einem hemmenden Effekt der ET(A)-spezifischen Autoantikörper ausgegangen werden. Bei Vorbehandlung mit YFLLRN ergab sich eine Erniedrigung der Pulsationsrate um $-14,2 \pm 1,0$ Schläge/min. Wurde dann im Fall der Vorbehandlung mit BQ610 das inhibitorische Peptid YFLLRN zugegeben und im Fall der Vorbehandlung mit YFLLRN der ET(A)-Rezeptorantagonist BQ610, so lagen die Pulsationsraten wieder auf der Höhe des Basalniveaus. Dieses Experiment bestätigte die Aktivität von Autoantikörpern gegen die Rezeptoren PAR und ET(A) in Patienten-IgG.

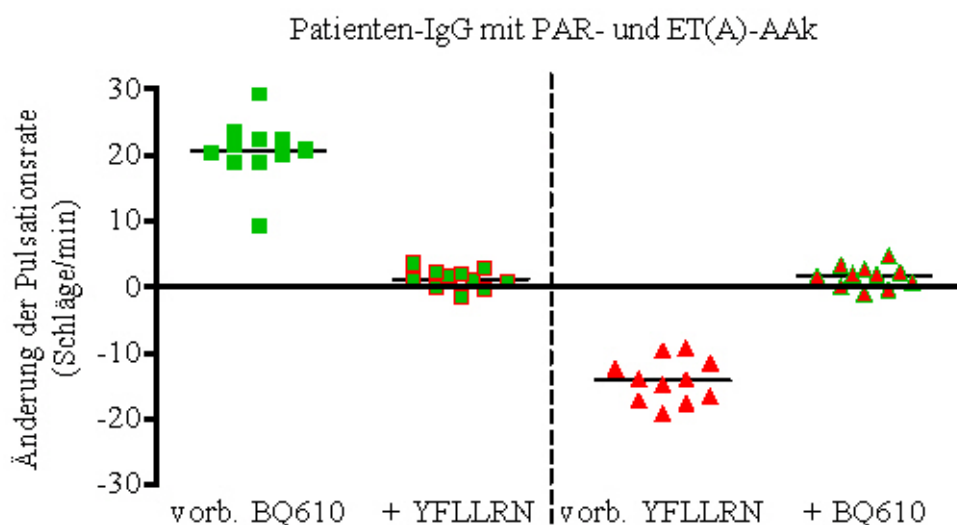


Abb. 9: Änderung der Pulsationsrate von Kardiomyozyten nach Vorbehandlung mit einem Rezeptorblocker und anschließender Zugabe des zweiten Blockers. (vorb. = vorbehandelt mit) YFLLRN: Thrombin-Rezeptor-inhibitorisches Peptid ($1 \mu\text{g/ml}$), BQ610: ET(A)-Blocker ($1 \mu\text{M}$)

Eine Stichprobe von 32 Seren von Patienten mit Raynaud-Syndrom bestätigte die unter 1.2.1 auf Seite 13 angeführte Häufung des Frauenanteils bei dieser Erkrankung. Von den 32 Patienten mit Raynaud-Syndrom waren 27 Frauen. Das entspricht einem Verhältnis von Frauen zu Männern wie 5,4:1. Das Vorkommen von Autoantikörpern ist in Tab. 7 wiedergegeben. Fünfzehn der 32 untersuchten Patientenserum enthielten Antikörper gegen PAR1/2. Zwölf Patienten enthielten sowohl Antikörper gegen PAR1/2 als auch gegen den ET(A)-Rezeptor. In einem Patientenserum wurden ausschließlich Antikörper gegen den ET(A)-Rezeptor nachgewiesen. In vier der 32 Patientenserum waren mit der verwendeten Methode keine Autoantikörper nachweisbar.

3. Ergebnisse

Tab. 7: Vorkommen von Autoantikörpern bei einer Stichprobe von 32 Patienten mit Raynaud-Syndrom

Autoantikörper gegen	Anzahl der Patienten mit Raynaud-Syndrom	das entspricht
PAR1/2	15	46,9 %
PAR1/2 und ET(A)	12	37,5 %
ET(A)	1	3,1 %
(keine)	4	12,5 %
Summe	32	100,0 %

3.1.3 Dosis-Wirkungskurven der PAR- und ET(A)-Autoantikörper

Am Beispiel dreier Patienten-IgG-Präparate mit PAR-Autoantikörpern wurde eine Dosis-Wirkungskurve im System der spontan pulsierenden Ratten-Kardiomyozyten erstellt (Abb. 10). Um allein die Effekte der PAR-Autoantikörper zu messen, wurden die Kardiomyozyten für 10 min mit dem ET(A)-Rezeptor-Antagonisten BQ610 (1 μ M) vorbehandelt. Die Autoantikörper erhöhten dosisabhängig die Pulsationsrate der Kardiomyozyten. Die maximale Antwort wurde bei einer IgG-Verdünnung von 1:40 ermittelt. Zur Ermittlung des maximalen Effektes, der über den ET(A)-Rezeptor vermittelt wurde, wurden die Kardiomyozyten mit dem inhibitorischen Peptid YFLLRN (100 ng/ml) vorbehandelt. Die Autoantikörper gegen den ET(A)-Rezeptor induzierten einen dosisabhängigen, negativ chronotropen Effekt. Zur Analyse der Autoantikörper-Effekte wurden die Immunglobuline in einer Verdünnung von 1:40 eingesetzt.

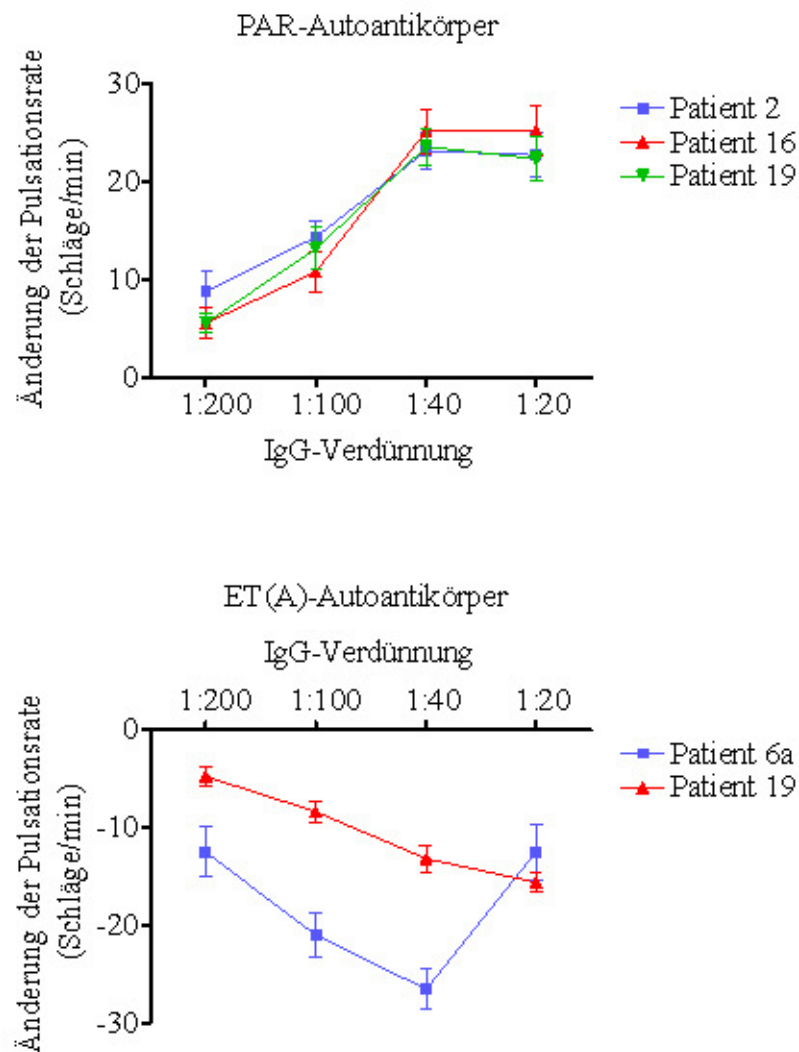


Abb. 10: Dosis-Wirkungskurven von IgG-Präparaten mit Autoantikörpern gegen die Rezeptoren PAR oder ET(A)

3.1.4 Spezifität der Autoantikörper gegen den Protease-aktivierten Rezeptor

Bisher konnte gezeigt werden, dass der Effekt der Autoantikörper gegen den Protease-aktivierten Rezeptor (PAR) auf die Pulsationsrate der Kardiomyozyten durch das Thrombin-Rezeptor-inhibitorische Peptid YFLLRN geblockt wurde. Die Spezifität dieser Autoantikörper sollte näher untersucht werden. Dazu wurde das IgG mit Autoantikörpern gegen PAR mit unterschiedlichen Peptiden 10 min vorinkubiert (Abb. 11). Diese Peptide entsprachen Sequenzen aus dem Loop II von PAR1 oder PAR2, dem Loop I von PAR2, dem N-Terminus von PAR2 und dem Loop II des β_1 -adrenergen Rezeptors (Tab. 8). Die Peptide aus dem Loop II von PAR1 und von PAR2 neutralisierten den positiv chronotropen Effekt der PAR-Autoantikörper aus drei getesteten Patienten-IgGs. Diese zwei Peptide enthalten einen Abschnitt mit der gleichen Aminosäuresequenz (siehe Tab. 8). Die anderen verwendeten

3. Ergebnisse

Peptide hatten keinen Neutralisierungseffekt. Dieses Experiment zeigte, dass die PAR-Autoantikörper an Epitope aus Loop II von PAR1 und von PAR2 binden.

Tab. 8: Verwendete Peptide zum Testen der Neutralisierungsfähigkeit von PAR-Autoantikörpern. Die Angaben entsprechen den Humansequenzen. Gleiche Sequenzen sind hervorgehoben. Die Peptide aus Loop II von PAR1 und PAR2 neutralisierten die PAR-Autoantikörper.

Lokalisation	Aminosäurenposition	Aminosäuresequenz
PAR1 Loop II	242-263	QTIQVPGLN ITTC HDV L WETLL
PAR2 Loop I	131-149	KIAYHIHGNNWIYGEALCN
PAR2 Loop II	214-235	QTIFIPAL NITTC HDV L PEQLL
PAR2 N-terminal	29-47	FSVDEFSASVLTGKLTTVF
β_1 -adren. Rez. Loop II	196-221	HWWR A ESDEARRCYNDPKCCDFVTN

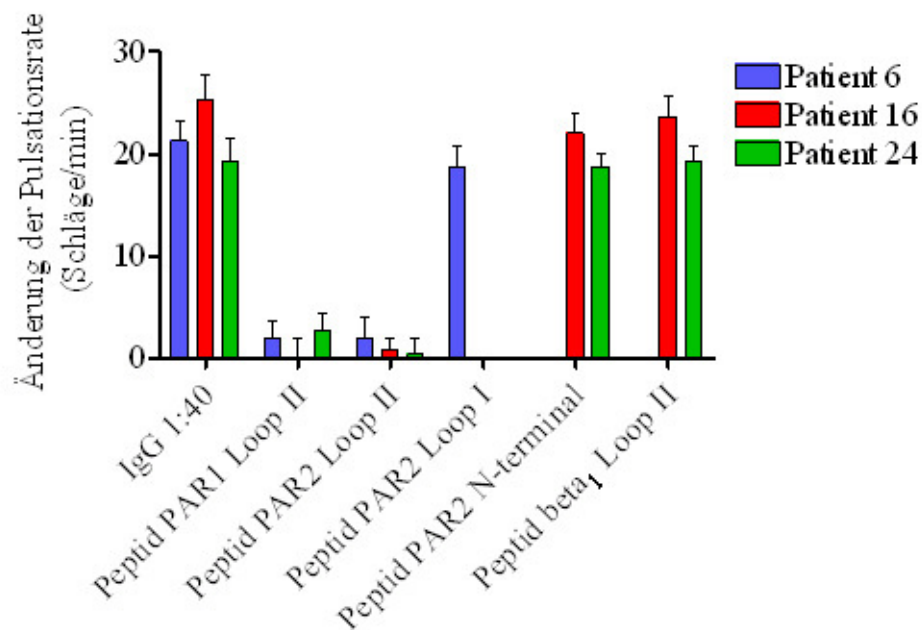


Abb. 11: Neutralisierung von Autoantikörpern gegen den Protease-aktivierten Rezeptor (PAR) durch Vorinkubation mit den Peptiden des Loops II von PAR1 und PAR2. (Achtfachbestimmung)

3.1.5 Quantifizierung von pERK1/2 und p67^{phox} mittels Western-Blot

3.1.5.1 *Stimulation von Kardiomyozyten mit Endothelin-1, Thrombin und SFLLRN in serumhaltigem oder serumfreiem Medium*

Die zeitlichen Abhängigkeiten der Aktivierung von ERK1/2 und der p67^{phox}-Expression durch Endothelin-1, Thrombin und das Peptid SFLLRN wurden untersucht. Die Stimulation der neonatalen Ratten-Kardiomyozyten erfolgte in serumhaltigem oder serumfreiem Medium über einen Zeitraum von 1 min bis 24 h. Die Werte wurden auf den 10-Minuten-Wert der jeweils mitgeführten Kontrolle (A. dest.) bezogen. Dieser wurde gleich 1 gesetzt. Die Ergebnisse sind in Abb. 12 und Abb. 13 dargestellt.

Bei Stimulation mit 10 nM Endothelin-1 war die Phosphorylierung von ERK1/2 in den Zellen stärker, die ohne Serum kultiviert wurden, als in denen, die mit Serum kultiviert wurden (Abb. 12). Thrombin (1 E/ml) bewirkte ohne Serum eine leicht stärkere Phosphorylierung von ERK1/2 als mit Serum. Bei der A. dest.-Kontrolle und bei Stimulation mit 10 µM SFLLRN-Peptid unterschieden sich die Werte für pERK1/2 mit und ohne Serum nicht voneinander.

Im Vergleich zur Kontrolle zeigte Endothelin-1 eine stärkere Aktivierung von ERK1/2 ohne Serum und bis zu 30 min Stimulation auch mit Serum. Mit Thrombin in serumfreiem Medium stimulierte Zellen zeigten eine leicht höhere Aktivierung von ERK1/2 als die Kontrolle. Erhöhte Messwerte für pERK1/2 ergaben sich bei Stimulation mit SFLLRN nur bis zu einer Stimulationszeit von 2 min.

3. Ergebnisse

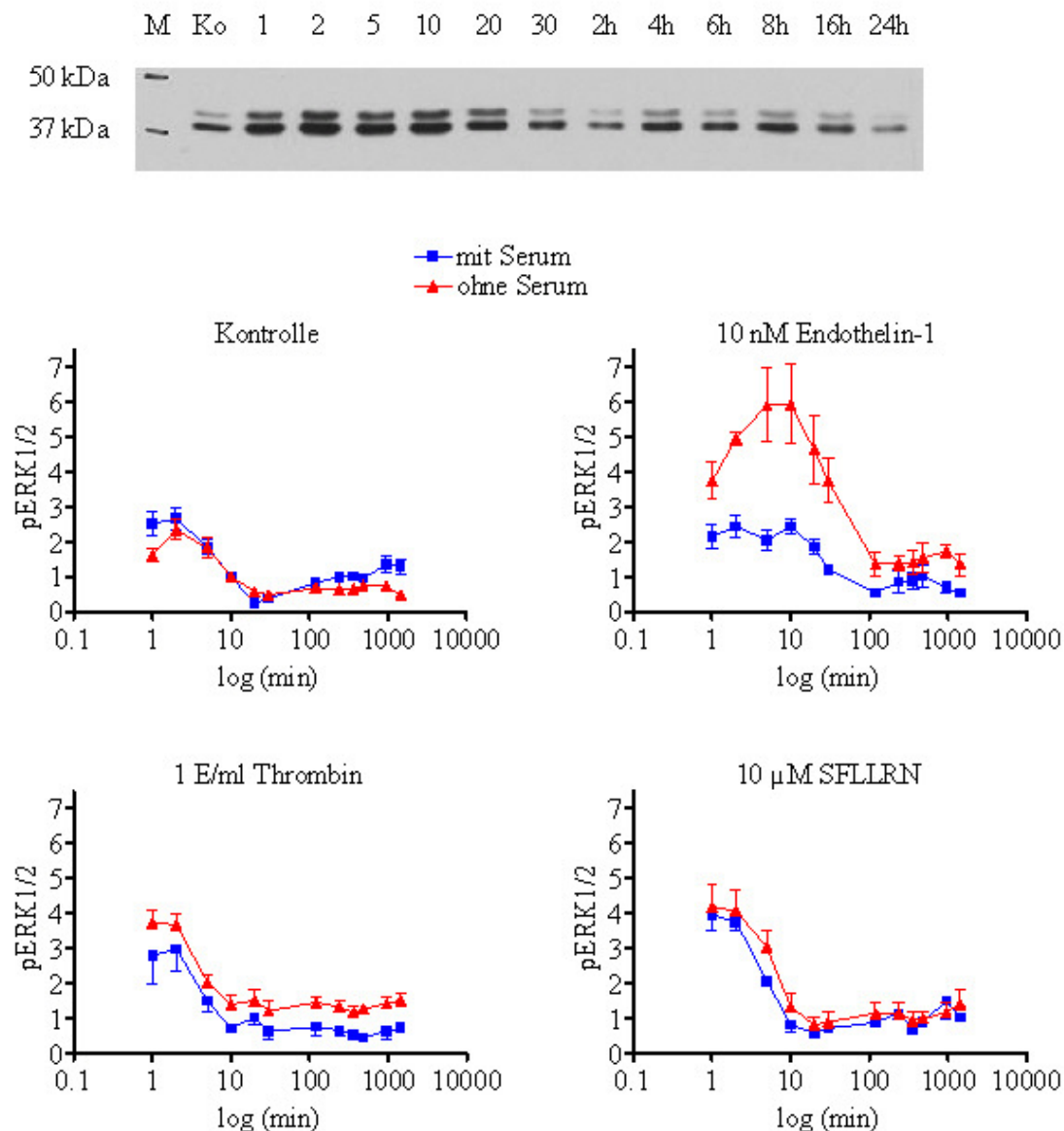


Abb. 12: Aktivierung von ERK1/2 in neonatalen Ratten-Kardiomyozyten nach Stimulation mit Endothelin-1, Thrombin und SFLLRN. Die Stimulation erfolgte in serumhaltigem oder serumfreiem Medium für 1 min bis 24 h. Das Foto zeigt ein Beispiel für die Stimulation mit ET-1 in serumhaltigem Medium (M: Molekulargewichtsmarker, Ko: A. dest.-Kontrolle 10 min). (Kontrolle: n=11, Endothelin-1: n=3, Thrombin: n=4, SFLLRN: n=4, n jeweils gleich für serumhaltiges und serumfreies Medium)

Die Ergebnisse zur Bestimmung des p67^{phox}-Proteins sind in Abb. 13 dargestellt. Mit 10 μM SFLLRN wurde mehr p67^{phox} nachgewiesen in serumhaltigem Medium als in serumfreiem. Ansonsten unterschieden sich die Werte mit und ohne Serum nicht deutlich voneinander. In serumhaltigem Medium war der p67^{phox}-Level nach Stimulation mit SFLLRN durchschnittlich höher als bei der Kontrolle, aber der Level unterlag starken Schwankungen.

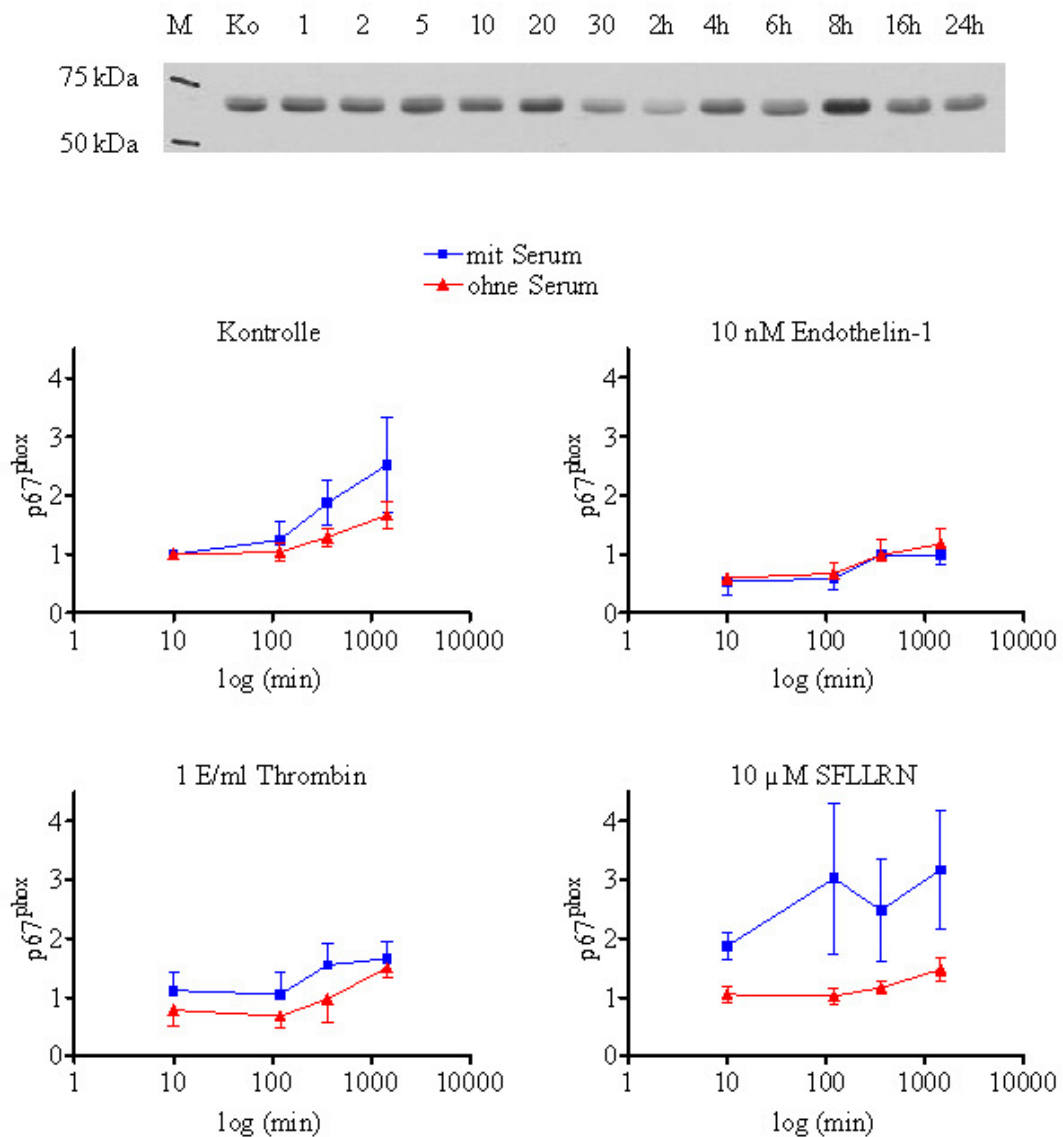


Abb. 13: Quantifizierung von p67^{phox} in neonatalen Ratten-Kardiomyozyten nach Stimulation mit Endothelin-1, Thrombin und SFLLRN. Die Stimulation erfolgte in serumhaltigem oder serumfreiem Medium. Das Foto zeigt ein Beispiel für die Stimulation mit ET-1 in serumhaltigem Medium (M: Molekulargewichtsmarker, Ko: A. dest.-Kontrolle 10 min). Dargestellt sind die Werte nach 10 min, 2 h, 6 h und 24 h. (Kontrolle mit Serum: n=11, Kontrolle ohne Serum: n=10, Endothelin-1: jeweils n=3, Thrombin mit Serum: n=4, Thrombin ohne Serum: n=3, SFLLRN: jeweils n=4)

3. Ergebnisse

3.1.5.2 Stimulation mit IL-1 β

Die Phosphorylierung von ERK1/2 nahm nach 5 min Stimulation mit IL-1 β zu (Abb. 14, Wilcoxon-Rang-Test: n.s.). Dieser Effekt war in serumhaltigem Medium deutlicher als in serumfreiem. Nach 20 min Stimulationszeit mit IL-1 β lag der Level der ERK1/2-Phosphorylierung mit und ohne Serum noch über dem der Kontrolle (Mann-Whitney-Test: n.s.). Nach 2 h und länger konnte kein deutlicher Unterschied zur Kontrolle festgestellt werden.

Die Quantifizierung von p67^{phox} (Abb. 15) ergab größere Standardabweichungen. Bis zu der Stimulationszeit von 24 h konnten zwischen der Kontrolle und der Stimulation oder zwischen serumhaltigem und serumfreiem Medium keine Unterschiede festgestellt werden.

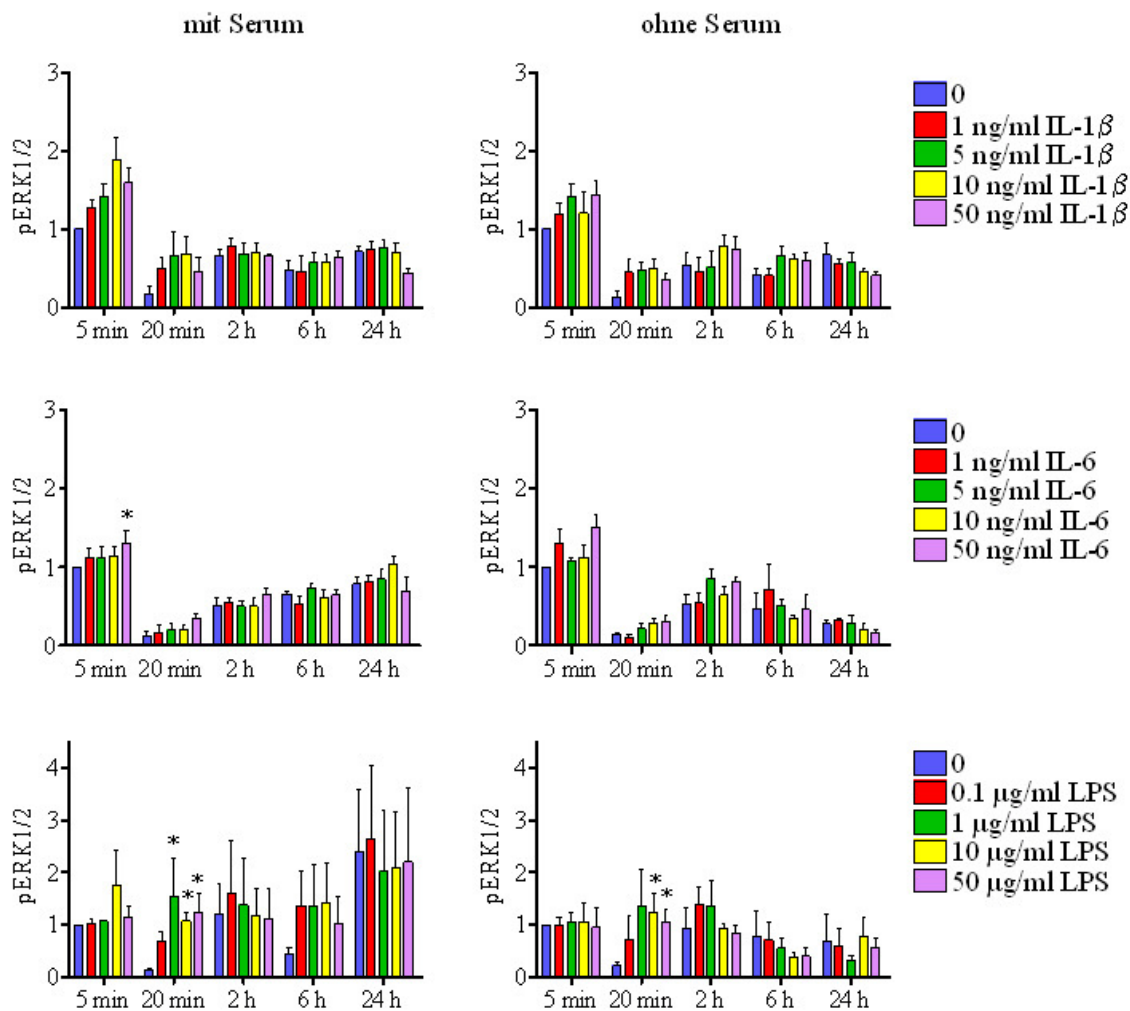


Abb. 14: Phosphorylierung von ERK1/2 in neonatalen Ratten-Kardiomyozyten nach Stimulation mit IL-1 β , IL-6 oder LPS. Die Stimulation erfolgte in serumhaltigem oder serumfreiem Medium für 5 min bis 24 h. (IL-1 β : jeweils n=4; IL-6: mit Serum n=5, ohne Serum n=4; LPS: jeweils n=4)

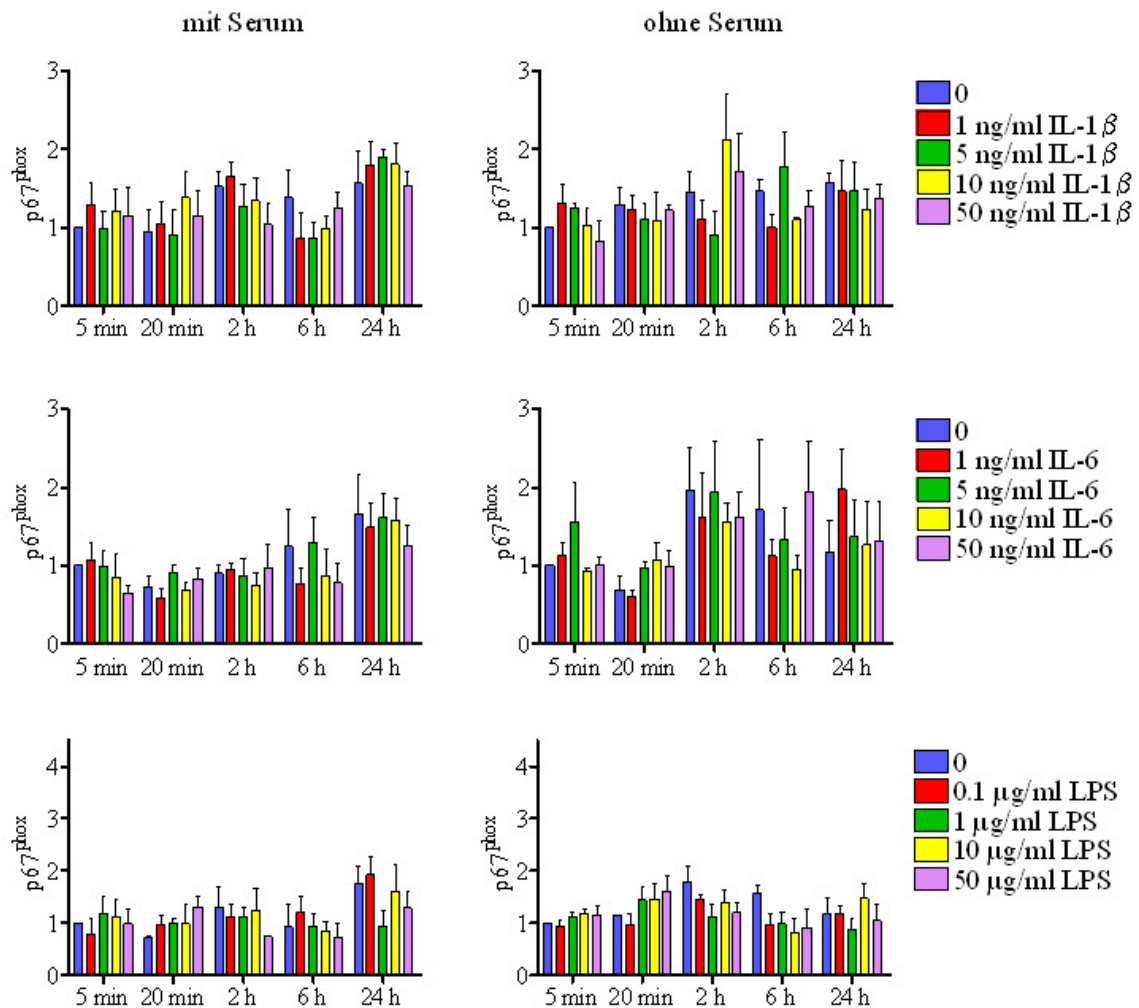


Abb. 15: Quantifizierung von p67^{phox} in neonatalen Ratten-Kardiomyozyten nach Stimulation mit IL-1 β , IL-6 oder LPS. Die Stimulation erfolgte in serumhaltigem oder serumfreiem Medium für 5 min bis 24 h. (IL-1 β : jeweils n=4; IL-6: mit Serum n=5, ohne Serum n=4; LPS: jeweils n=4)

3.1.5.3 Stimulation mit IL-6

In serumhaltigem wie auch in serumfreiem Medium lag der pERK1/2-Level nach 5 und 20 min Stimulation mit 50 ng/ml IL-6 über dem der Kontrolle (Abb. 14) (serumhaltig, 5 min, Wilcoxon-Rang-Test: p=0,03; im serumfreien Medium nach 5 min und in beiden Medien nach 20 min: n.s.). Der p67^{phox}-Level zeigte zum Teil starke Schwankungen (Abb. 15). Deutliche Unterschiede zur Kontrolle waren hier auch nach 24 h Stimulation nicht erkennbar.

3. Ergebnisse

3.1.5.4 Stimulation mit LPS

Nach 20 min Stimulationszeit stieg ab 0,1 µg/ml LPS die ERK1/2-Phosphorylierung in beiden Systemen im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 14) (Mann-Whitney-Test, serumhaltig, 1 µg/ml: $p=0,03$; 10 µg/ml: $p=0,03$; 50 µg/ml: $p=0,03$; serumfrei, 10 µg/ml: $p=0,03$; 50 µg/ml: $p=0,03$). Konzentrationen größer als 1 µg/ml LPS bewirkten hier aber keinen weiteren Anstieg von pERK1/2. Nach längerer Stimulationszeit war die Streuung der Messwerte im serumhaltigen Milieu größer und es waren keine Abhängigkeiten von der LPS-Konzentration erkennbar. Die Bestimmung von p67^{phox} ließ keine Veränderungen erkennen (Abb. 15).

3.1.5.5 Stimulation mit Antikörper-Präparaten

Aus den vorangegangenen Versuchen war erkennbar, dass die Phosphorylierung von ERK1/2 nach 20 min Stimulation mit IL-1 β , IL-6 oder LPS im Vergleich zur Kontrolle erhöht war. Das Peptid SFLLRN und Endothelin-1 bewirkten nach dieser Zeit ebenfalls eine Erhöhung von pERK1/2. Deshalb wurden neonatale Ratten-Kardiomyozyten 20 min mit einem Antikörper-Präparat mit oder ohne IL-1 β (1 ng/ml), IL-6 (1 ng/ml) oder LPS (0,1 µg/ml) inkubiert. Neben den Patienten-IgGs mit Autoantikörpern gegen PAR1/2 oder ET(A) wurde auch ein aus Kaninchen gewonnener, funktioneller Autoantikörper gegen PAR2 (P261) getestet [125]. Das Peptid SFLLRN (10 µM) und Endothelin-1 (10 nM) wurden ebenfalls mitgeführt. Zum Vergleich wurde zusätzlich zu IgG von Kontrollpersonen auch das therapeutische Endobulin in der Verdünnung 1:40 verwendet. Das ist ein polyvalentes, intravenös verabreichbares Immunglobulin. Anschließend wurden pERK1/2 und p67^{phox} mit Hilfe des Western-Blots quantifiziert. Dabei wurde die jeweilige Kontrolle (20 min A. dest.) gleich 1 gesetzt. Das Ergebnis ist in Abb. 16 dargestellt.

Patienten-IgG mit Autoantikörper gegen PAR1/2 (Patienten 6, 16, 17, 18, 19, 20) bewirkten eine gleich starke Phosphorylierung von ERK1/2 wie SFLLRN (3-faches der Kontrolle). Auch der Kaninchen-Antikörper gegen PAR2 ließ pERK1/2 auf einen vergleichbaren Level steigen (2,6-fach). Patienten-IgG mit Autoantikörper gegen ET(A) (Patienten 6a, 21a, 22a, 23a) erhöhten kaum den Phosphorylierungslevel von ERK1/2 (1,6-fach), im Gegensatz zu Endothelin-1 (6,3-fach). Unter den verschiedenen IgGs stimulierten die von Kontrollpersonen generierten IgG-Präparate (Kontrollen 2, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11) am stärksten die ERK1/2-Phosphorylierung (5,1-fach). Die Werte für das Endobulin hingegen sind vergleichbar mit der A. dest.-Kontrolle (0,7-fach). Die Coinkubation mit IL-1 β führte zu einer weiteren Verstärkung der Phosphorylierung. Im Falle des Kontroll-IgGs ist dieser Unterschied vernachlässigbar. Die Coinkubation mit IL-6 oder LPS bewirkte keine Erhöhung der ERK1/2-Phosphorylierung.

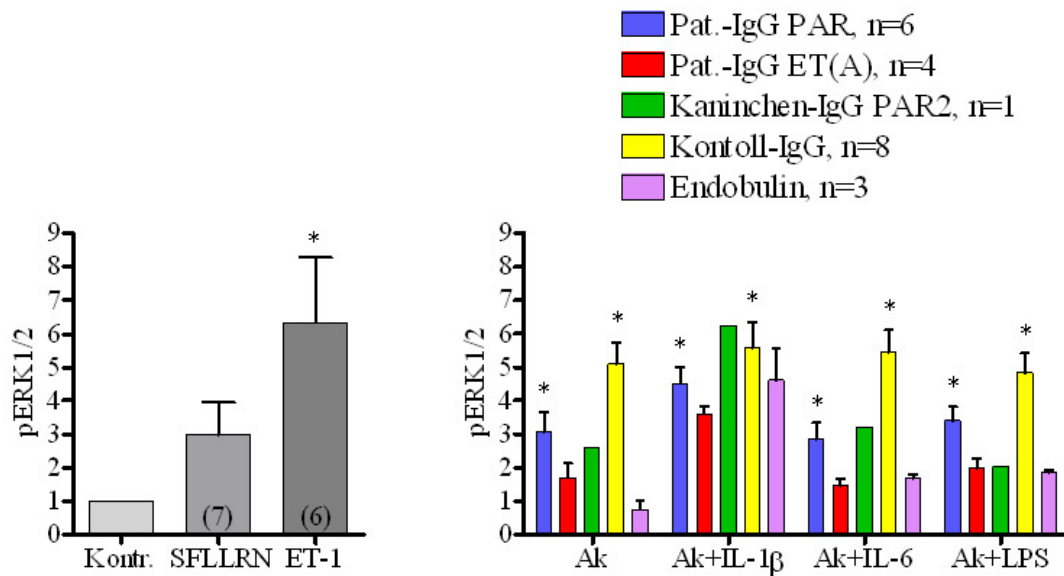


Abb. 16: Quantifizierung von pERK1/2 in neonatalen Ratten-Kardiomyozyten nach Stimulation mit Antikörper-Präparaten für 20 min in serumhaltigem Medium. Mit dem Wilcoxon-Rang-Test wurden signifikante Unterschiede zur Kontrolle=1 errechnet (ET-1: $p=0,0156$; Patienten-IgG mit PAR-Autoantikörper: jeweils $p=0,0156$; Kontroll-IgG: jeweils $p=0,0039$).

3.2 Untersuchungen an Glatten Muskelzellen humaner Coronararterien (hCASCs)

3.2.1 Quantifizierung von pERK1/2, Tissue Factor und p67^{phox} mittels Western-Blot

3.2.1.1 Stimulation mit Endothelin-1, Thrombin und SFLLRN

Humane CASCs wurden mit Thrombin (1 E/ml), SFLLRN (10 μ M) oder ET-1 (10 nM) für 1 min bis 24 h inkubiert (Abb. 17). Danach wurden pERK1/2, TF (*tissue factor*) und p67^{phox} mittels Western-Blot analysiert [126]. Die Werte wurden so berechnet, dass die jeweilige Kontrolle bei 10 min Stimulation den Wert 1 annahm. Neben einer leichten Erhöhung von pERK1/2 durch ET-1 nach 20 min (n.s.) konnten keinerlei signifikante Veränderungen der untersuchten Proteine im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden (Mann-Whitney-Tests). Die Standardabweichungen waren zum Teil sehr groß.

3. Ergebnisse

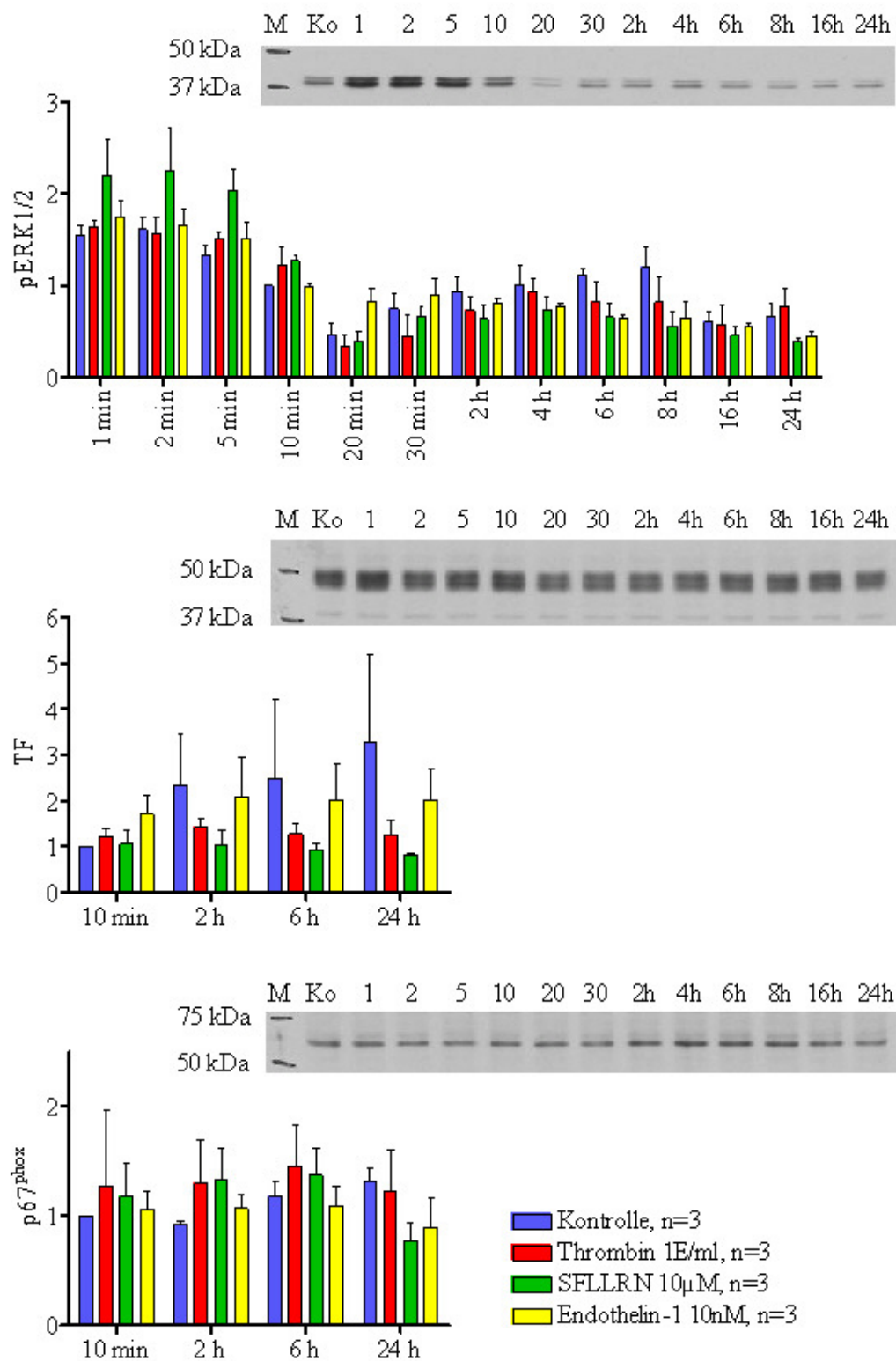


Abb. 17: Quantifizierung von pERK1/2, TF und p67^{phox} in hCASMCs nach Stimulation mit Thrombin, Peptid SFLLRN oder Endothelin-1 in serumhaltigem Medium für 1 min bis 24 h. Die Fotos zeigen als Beispiel eine Stimulation mit SFLLRN (M: Molekulargewichtsmarker, Ko: A. dest.-Kontrolle 10 min).

3.2.1.2 Stimulation mit IL-1 β

Die TF-Bestimmung bei hCASMCs nach Stimulation mit IL-1 β (Abb. 18) zeigte nach 5 min eine leichte Erhöhung (Wilcoxon-Rang-Test: n.s.) und nach 2 h konzentrationsabhängig eine leichte, jedoch nicht signifikante Erniedrigung (Mann-Whitney-Test). Auf die Phosphorylierung von ERK1/2 hatte IL-1 β keinen Einfluss. Ein im Vergleich zur Kontrolle leicht erniedrigter p67^{phox}-Level (Mann-Whitney-Test: n.s.) wurde nach 24 h Stimulation bei IL-1 β -Konzentrationen ≥ 5 ng/ml gemessen.

3. Ergebnisse

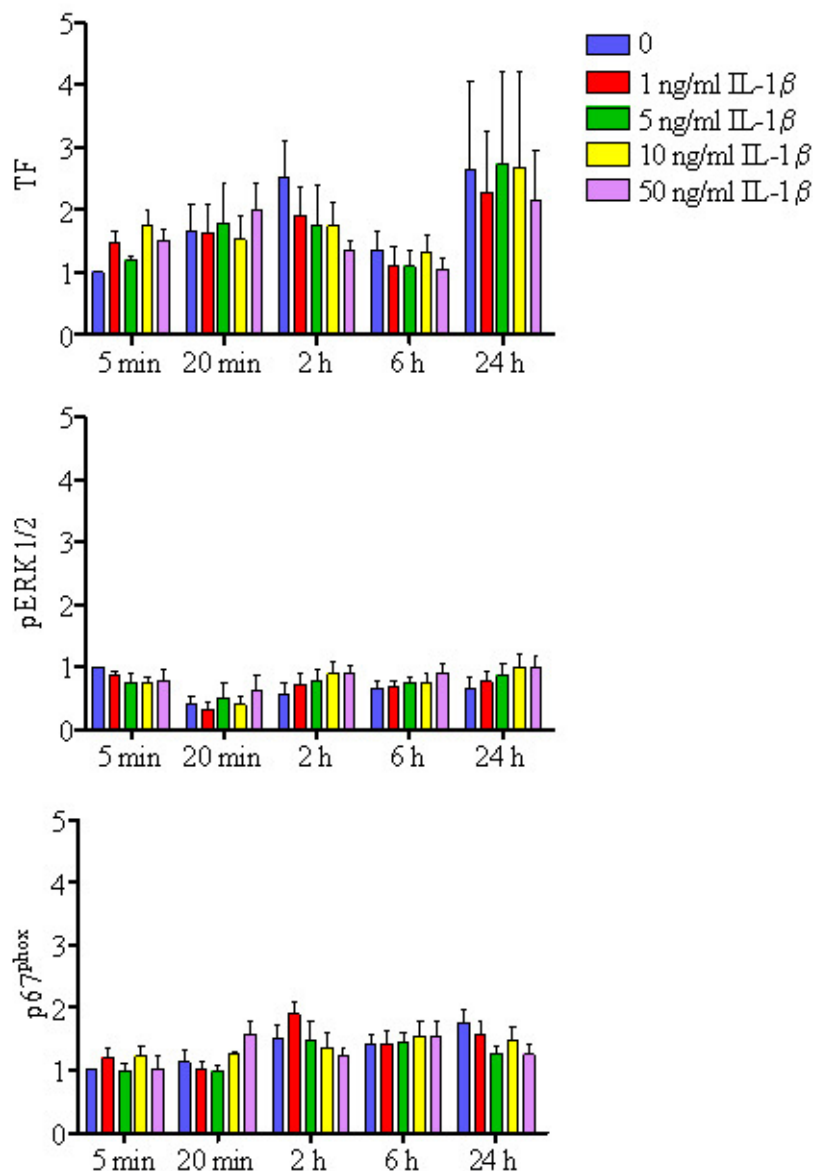


Abb. 18: Quantifizierung von TF, pERK1/2 und p67^{phox} in hCASCs nach Stimulation mit IL-1 β . Die Stimulation erfolgte in serumhaltigem Medium für 5 min bis 24 h mit IL-1 β -Konzentrationen von 1-50 ng/ml. (n=4)

3.2.1.3 Stimulation mit IL-6

Nach 5 min Stimulation von hCASCs mit IL-6 (Abb. 19) konnte ein im Vergleich zur Kontrolle erhöhter TF-Level gemessen werden. Der Effekt war bei der mittleren Konzentration von 5 ng/ml IL-6 am größten. Eine 20-minütige Stimulation ergab eine TF-Erhöhung nur noch mit der höchsten getesteten IL-6-Konzentration von 50 ng/ml. Im Gegensatz zu diesen Erhöhungen deutete sich eine leichte TF-Erniedrigung an bei 2-stündiger Stimulation mit 10 oder 50 ng/ml IL-6.

Die pERK1/2-Bestimmung zeigte eine hohe Reproduzierbarkeit und ließ einen leichten konzentrationsabhängigen Anstieg nach 6 h (Mann-Whitney-Test, 50 ng/ml: $p=0,03$) und 24 h (n.s.) Stimulation mit IL-6 erkennen. Dieses Stimulanz bewirkte aber bis 24 h keine Veränderung des $p67^{\text{phox}}$ -Levels.

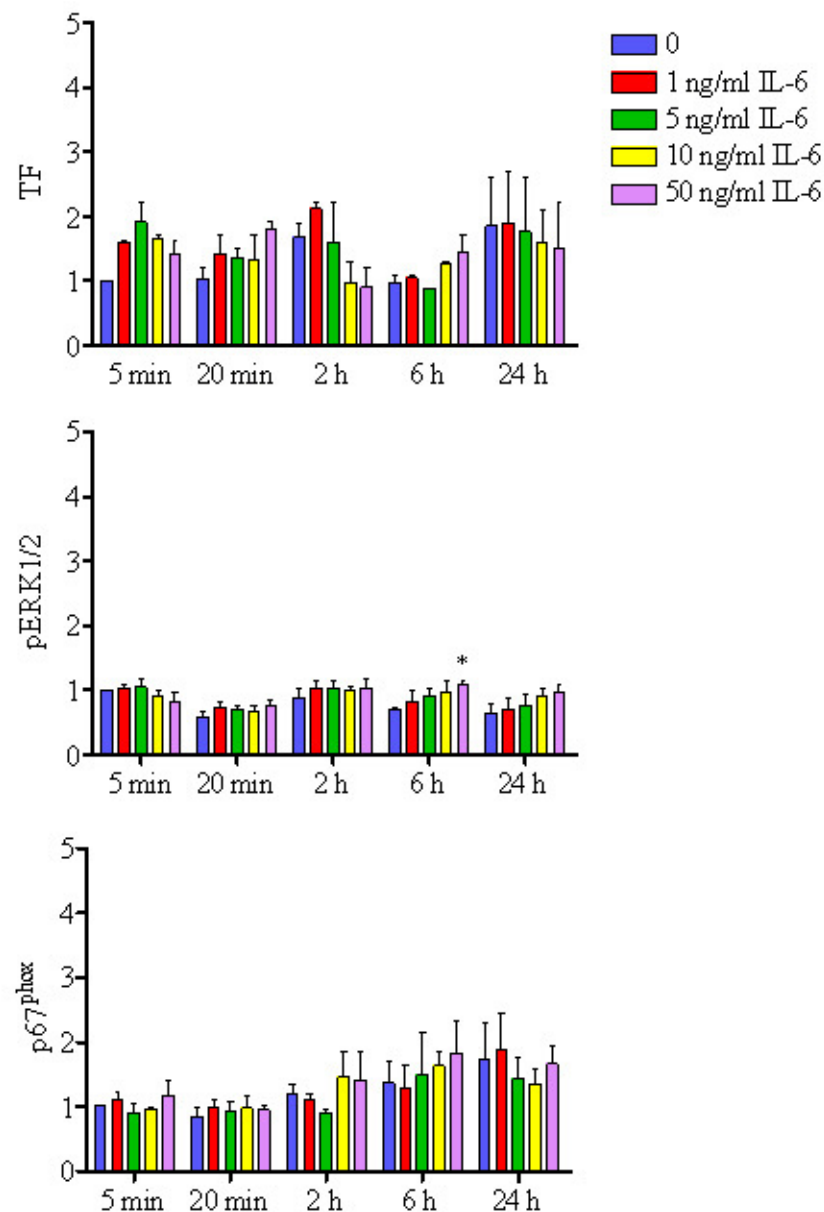


Abb. 19: Quantifizierung von TF, pERK1/2 und $p67^{\text{phox}}$ in hCAsMCs nach Stimulation mit IL-6. Die Stimulation erfolgte in serumhaltigem Medium für 5 min bis 24 h mit IL-6-Konzentrationen von 1-50 ng/ml. (TF: $n=2$; pERK1/2: $n=4$; $p67^{\text{phox}}$: $n=4$)

3.2.1.4 Stimulation mit LPS

3. Ergebnisse

Der TF-Level war nach 5 min Stimulation mit LPS im Vergleich zur Kontrolle leicht erhöht (Abb. 20), jedoch ohne Unterschiede zwischen den einzelnen Konzentrationen (Wilcoxon-Rang-Test, 1 µg/ml: n.s.). Keinen Einfluss hatte LPS auf den Phosphorylierungsgrad von ERK1/2. Die Proteinexpression von p67^{phox} zeigte nach 5-minütiger Stimulation einen konzentrationsabhängigen Anstieg gegenüber der Kontrolle (Wilcoxon-Rang-Test: n.s.). Nach 2 h mit 10 oder 50 µg/ml LPS war der p67^{phox}-Level erniedrigt (Mann-Whitney-Test jeweils p=0,03). Ab 0,1 µg/ml deutete sich hingegen nach 24 h wiederum eine p67^{phox}-Erhöhung an (jeweils n.s.). Die hohen Standardabweichungen erschweren jedoch die genaue Beurteilung.

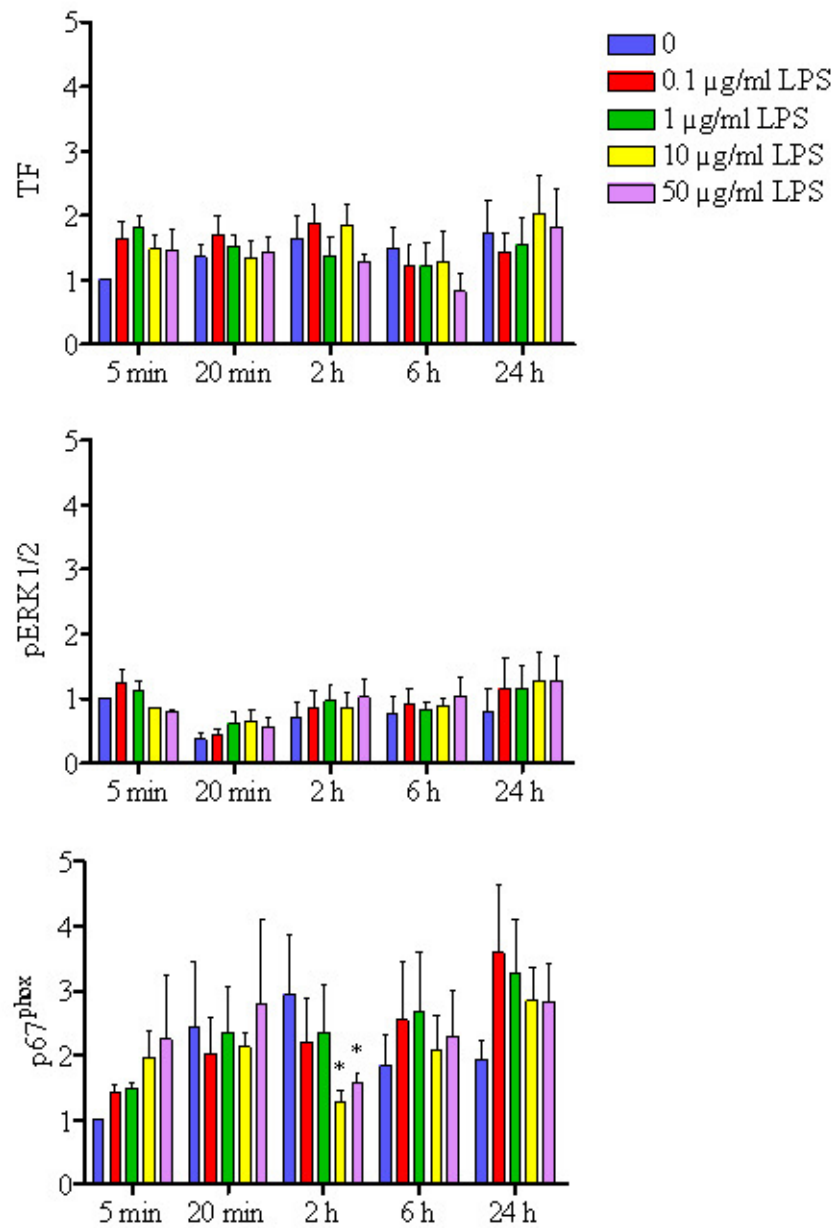


Abb. 20: Quantifizierung von TF, pERK1/2 und p67^{phox} in hCAsMCs nach Stimulation mit LPS. Die Stimulation erfolgte in serumhaltigem Medium für 5 min bis 24 h mit LPS-Konzentrationen von 0,1-50 µg/ml. (n=4)

3. Ergebnisse

3.2.1.5 Stimulation mit Antikörper-Präparaten

CASMCs wurden für 20 min mit verschiedenen Antikörper-Präparaten mit und ohne Zusatz von IL-1 β , IL-6 oder LPS inkubiert (Abb. 21). Zum Vergleich wurden außerdem das Peptid SFLLRN und ET-1 eingesetzt.

Hinsichtlich der Phosphorylierung von ERK1/2 zeichneten sich Tendenzen zur Erhöhung ab bei Stimulation mit Patienten-IgG mit Autoantikörper gegen PAR1/2 (Patienten 16, 17, 18, 19) und mit Kontroll-IgG (Kontrollen 4, 7, 9) (Wilcoxon-Rang-Tests: n.s.). Die zwei getesteten Präparate mit Autoantikörper gegen ET(A) waren von Patienten 6a und 23a. Eine Coinkubation mit IL-1 β , IL-6 oder LPS bewirkte keine Veränderung. Der pERK1/2-Level bei Stimulation mit Endothelin-1 war zwar leicht erhöht, jedoch nicht signifikant (Wilcoxon-Rang-Test).

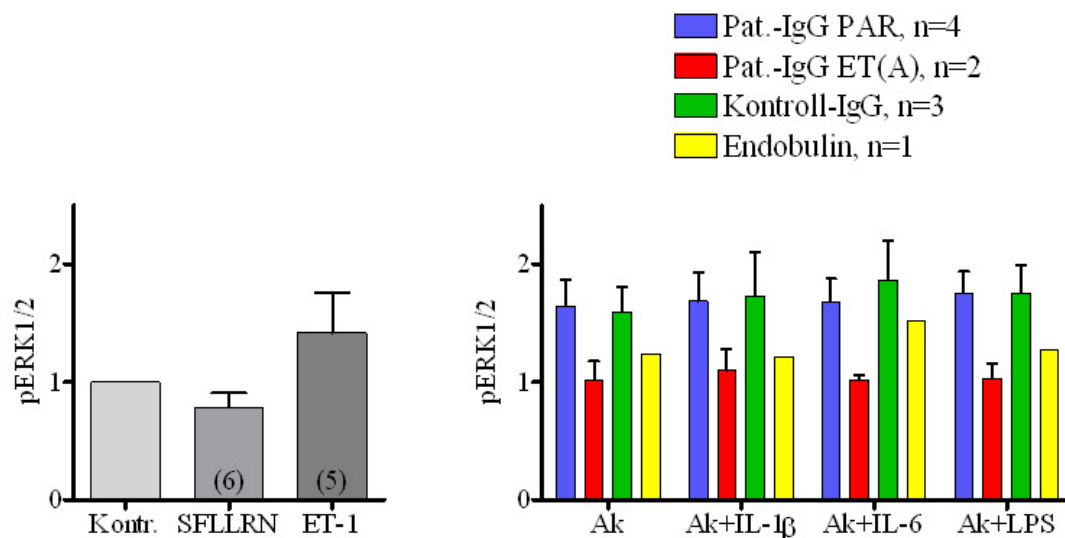


Abb. 21: Quantifizierung von pERK1/2 in hCASMCs nach Stimulation mit Antikörper-Präparaten für 20 min in serumhaltigem Medium

3.3 Untersuchungen an humanen Thrombozyten

3.3.1 Aggregometrie mit plättchenreichem Plasma und gewaschenen Thrombozyten

Um den Einfluss von Faktoren im Blutplasma der Thrombozytenspende auszuschließen, wurden die Thrombozyten für die Untersuchungen in dieser Arbeit gewaschen. In der klinischen Diagnostik wird für die Aggregometrie jedoch PRP (*platelet rich plasma*) verwendet. Es sollte untersucht werden, inwiefern sich die Messwerte gewaschener

Thrombozyten von denen mit PRP unterschieden. Als Stimulanzen wurden Collagen (190 $\mu\text{g/ml}$) und ADP (20 μM) eingesetzt (Abb. 22). Die Reaktion gewaschener Thrombozyten auf Collagen war signifikant vermindert. Die gewaschenen Thrombozyten aggregierten nicht, wenn sie mit ADP stimuliert wurden.

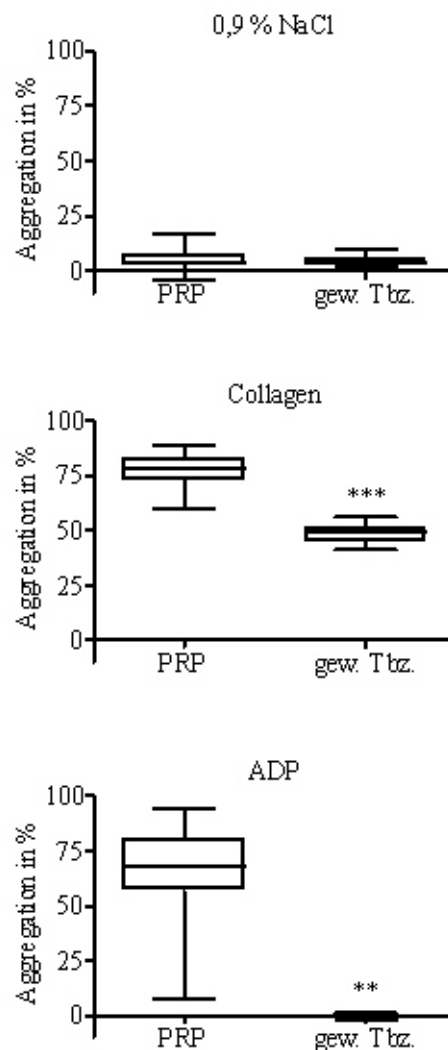


Abb. 22: Aggregometrie mit PRP und gewaschenen Thrombozyten. Stimulanzen waren Collagen bzw. ADP. Statistische Auswertung mit dem Mann-Whitney-Test. (Kontrolle: n=45 für PRP, n=10 für gew. Tbz.; Collagen: n=27 für PRP, n=10 für gew. Tbz.; ADP: n=44 für PRP, n=3 für gew. Tbz.)

Die bei der Thrombozytenpräparation verwendete Apyrase verhindert eine frühzeitige Aktivierung der Thrombozyten durch Spaltung von freiem ADP und ATP in der Suspension. Der letzte Waschschrift der Thrombozytenpräparation erfolgte ohne Zugabe von Apyrase. Dennoch sollte nun geprüft werden, ob ein vorhandener Rest der Apyrase in der Thrombozytensuspension die verminderten Reaktionen der Thrombozyten auf Collagen und ADP verursachte. Dazu wurden die Reaktionen mit und ohne Apyrase gewaschener Thrombozyten verglichen (Abb. 23). Bei Collagen war die Aggregation ohne Apyrase

3. Ergebnisse

signifikant vermindert, was auf die protektive Wirkung der Apyrase hinweist. Nach Stimulation mit ADP zeigten gewaschene Thrombozyten weder mit noch ohne Apyrase eine Aggregation. Die verminderte Lichtdurchlässigkeit gegenüber der Kontrolle (0,9 % NaCl) deutete auf eine Formumwandlung (*shape change*) der Thrombozyten, unabhängig von der Apyrase. Dieses Enzym ist nicht verantwortlich für die verminderte Aggregationsfähigkeit der Thrombozyten.

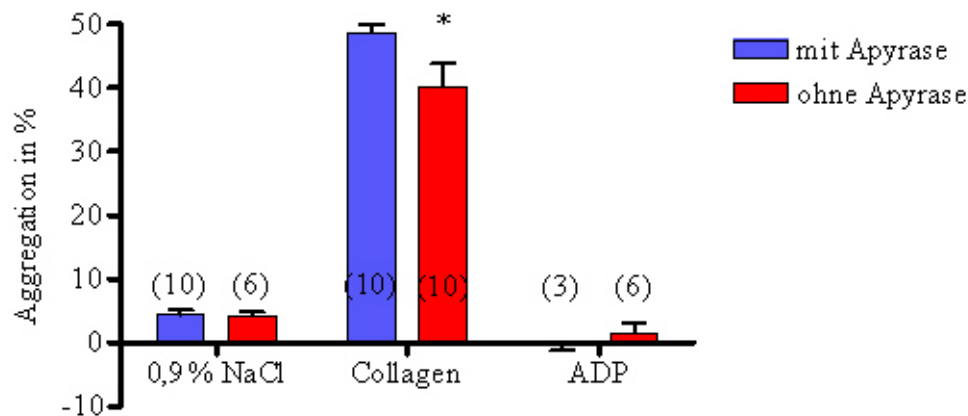


Abb. 23: Aggregation gewaschener Thrombozyten mit und ohne Verwendung von Apyrase. Statistische Auswertung mit dem Mann-Whitney-Test.

Danach wurde die Aggregation durch das PAR-aktivierende Peptid SFLLRN getestet. Abb. 24 zeigt die Abhängigkeit der Aggregation von der Peptidkonzentration. In diesem Versuch wurden PRP mit gewaschenen Thrombozyten verglichen. Die Aggregation gewaschener Thrombozyten war geringer als die von PRP. Bei einer Peptidkonzentration von 1 μ M erfolgte keine Aggregation. Bei einer Konzentration von 3 μ M SFLLRN war die Aggregation geringer als mit 10 μ M SFLLRN.

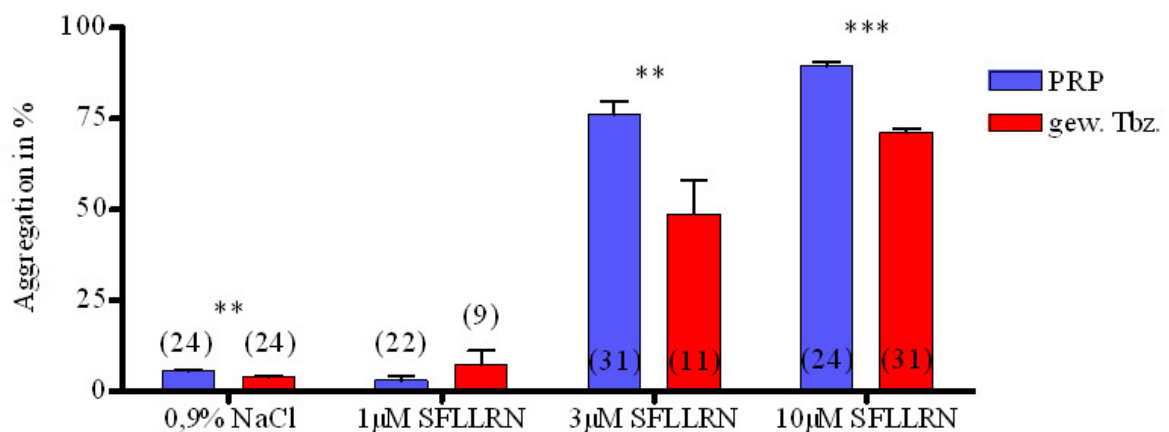


Abb. 24: Aggregometrie mit PRP und gewaschenen Thrombozyten. Stimulanz war das Peptid SFLLRN in den angegebenen Konzentrationen. Statistische Auswertung mit dem T-Test für ungepaarte Stichproben (0,9 % NaCl: $p=0,006$; 3 μM SFLLRN: $p=0,002$; 10 μM SFLLRN: $p<0,0001$).

3.3.2 Aggregation und Freisetzung von Serotonin

Die Aggregation in Prozent, der Slope (Anstieg des Aggregationsverlaufs) und die Serotoninfreisetzung wurden verglichen in Antwort auf verschiedene Konzentrationen von Thrombin, dem stimulatorischen Peptid SFLLRN und dem PAR1-spezifischen partiell-agonistischen Peptid YFLLRN (Abb. 25). Während der Slope bei mittleren Konzentrationen von Thrombin und dem Peptid SFLLRN ein Maximum zeigte und bei steigenden Konzentrationen wieder leicht abfiel, korrelierten die Kurvenverläufe der Serotonin-Freisetzungen mit denen der Aggregationen. Das Peptid YFLLRN bewirkte in niedriger Konzentration einen Formenwandel, jedoch keine Aggregation oder Serotonin-Freisetzung.

3. Ergebnisse

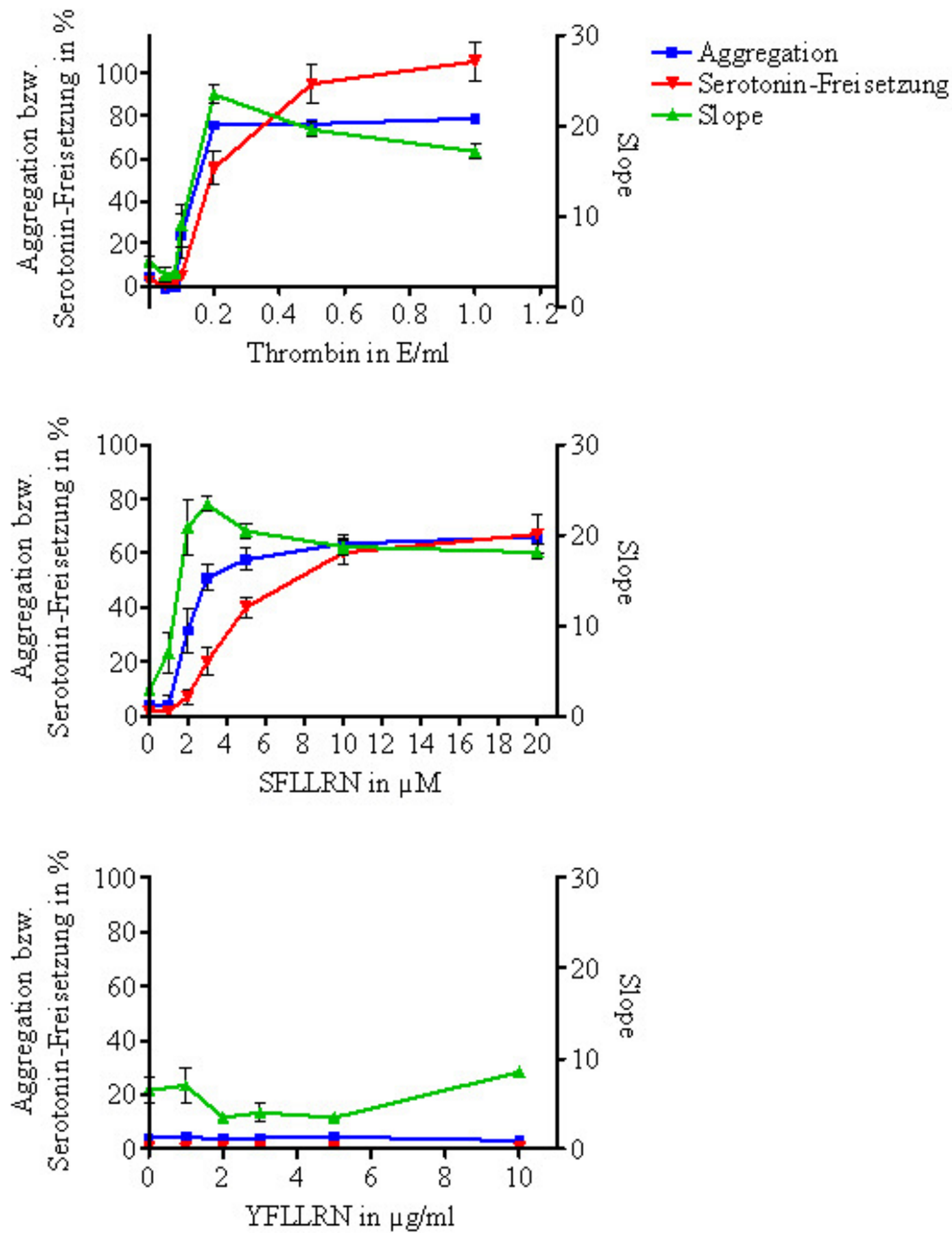


Abb. 25: Aggregation, Serotonin-Freisetzung und Slope in Abhängigkeit der Konzentration von Thrombin, SFLLRN bzw. YFLLRN bei gewaschenen Thrombozyten. (Thrombin: n=7, SFLLRN: n=7, YFLLRN: n=2)

3.3.3 Einfluss von Patienten-IgG auf die Thrombozytenfunktion

Es wurde untersucht, ob eine 30-minütige Vorinkubation der Thrombozyten mit Patienten-IgG die Aggregation oder die Serotonin-Freisetzung beeinflusste. Die IgG-Präparate von Patienten 1 bis 5 wurden getestet. Thrombozyten desselben Spenders wurden mit Patienten-IgG und zum Vergleich mit Kontroll-IgG vorinkubiert. Die Aggregation und damit die Serotonin-Freisetzung wurden durch 3 μ M und 10 μ M SFLLRN-Peptid initiiert. Entsprechend der verschiedenen Verfügbarkeit sowohl von IgG-Volumen als auch von Spenderthrombozyten wurden unterschiedlich viele Parameterkombinationen getestet. Zur Verdeutlichung des Unterschieds wurden die Differenzen, Messwert Patient minus Messwert Kontrolle, berechnet. Die Ergebnisse sind in Abb. 26 bis Abb. 30 dargestellt. Bei Vorinkubation der Thrombozyten mit IgG von Patient 1 waren die Aggregation und die Serotonin-Freisetzung bei 3 μ M SFLLRN-Peptid überwiegend stärker als bei Vorinkubation mit IgG von Kontrollen 1, 2, 3 oder 4. Dies deutete auf einen stimulierenden Effekt des IgGs von Patient 1 hin. Umgekehrt zeigte sich bei Patient 5 ein hemmender Einfluss auf die Aggregation und die Serotonin-Freisetzung bei Stimulation sowohl mit 3 μ M als auch mit 10 μ M SFLLRN. Bei Patienten 2, 3 und 4 konnten keine homogenen Effekte festgestellt werden.

3. Ergebnisse

Patient 1

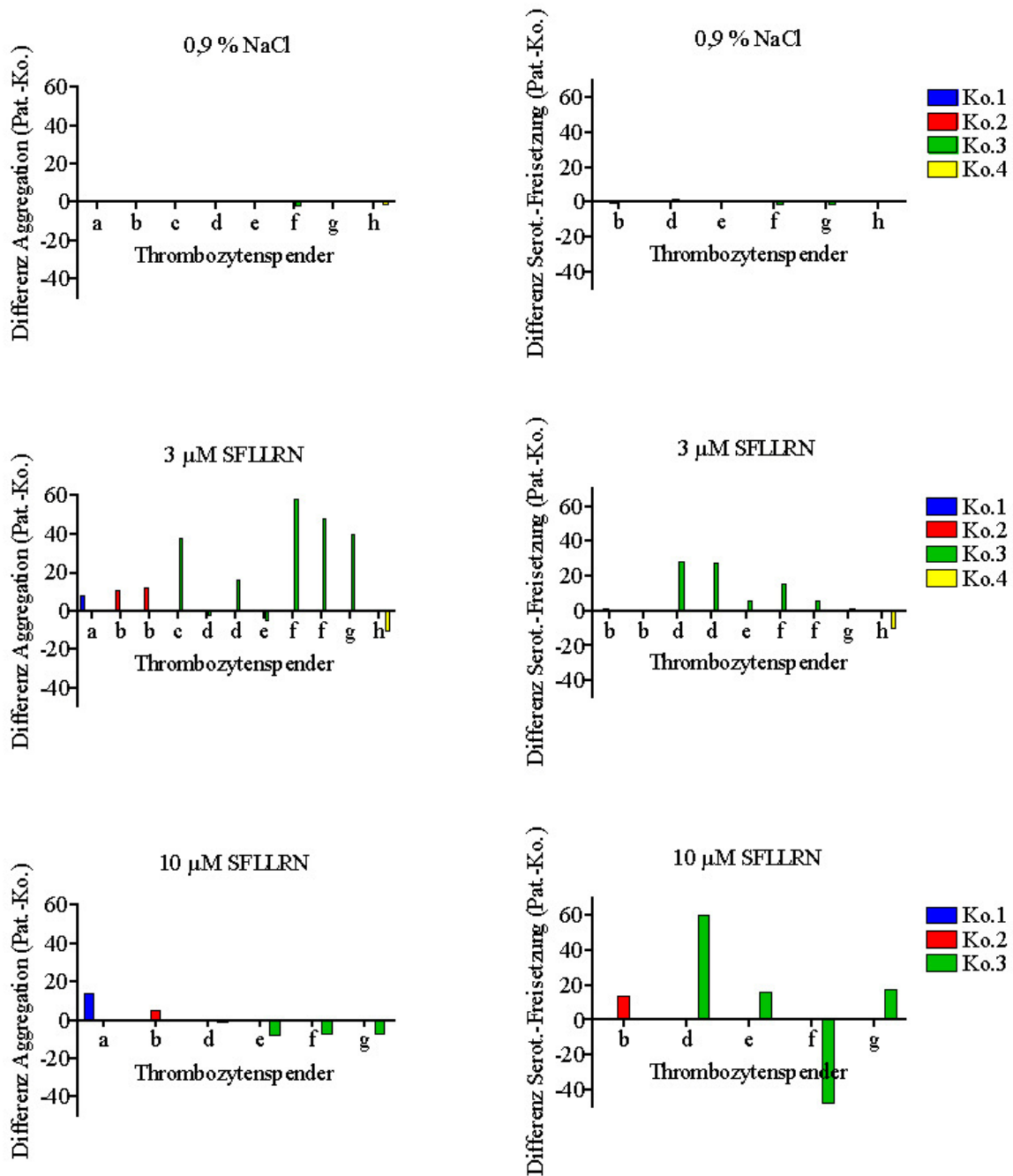


Abb. 26: Vergleich des Antikörperpräparats von Patient 1 mit Präparaten von Kontrollpersonen im Einfluss auf Thrombozyten-Aggregation und –Serotonin-Freisetzung unter Verwendung unterschiedlicher Thrombozytenspender

Patient 2

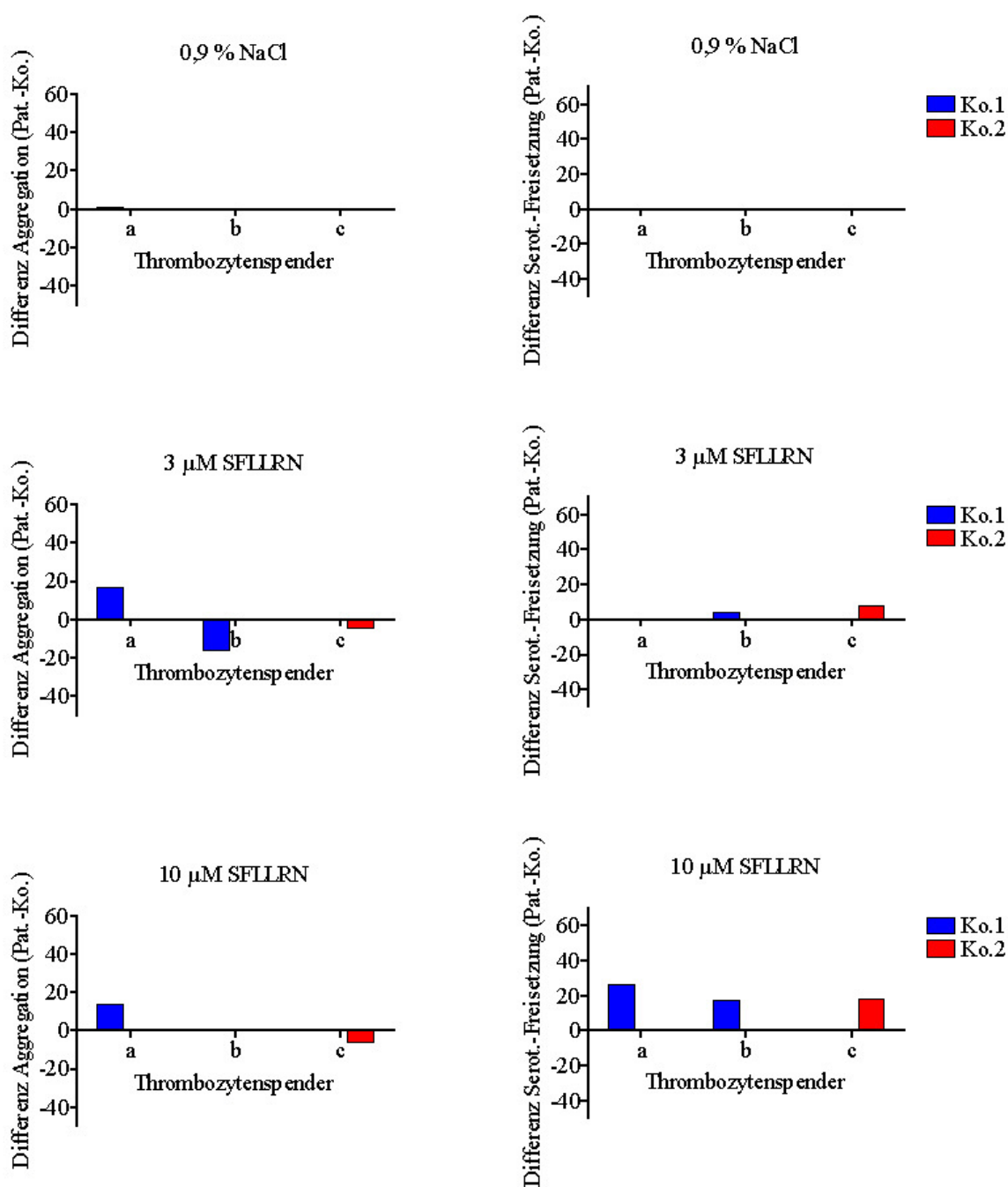


Abb. 27: Vergleich des Antikörperpräparats von Patient 2 mit Präparaten von Kontrollpersonen im Einfluss auf Thrombozyten-Aggregation und -Serotonin-Freisetzung unter Verwendung unterschiedlicher Thrombozytenspender

3. Ergebnisse

Patient 3

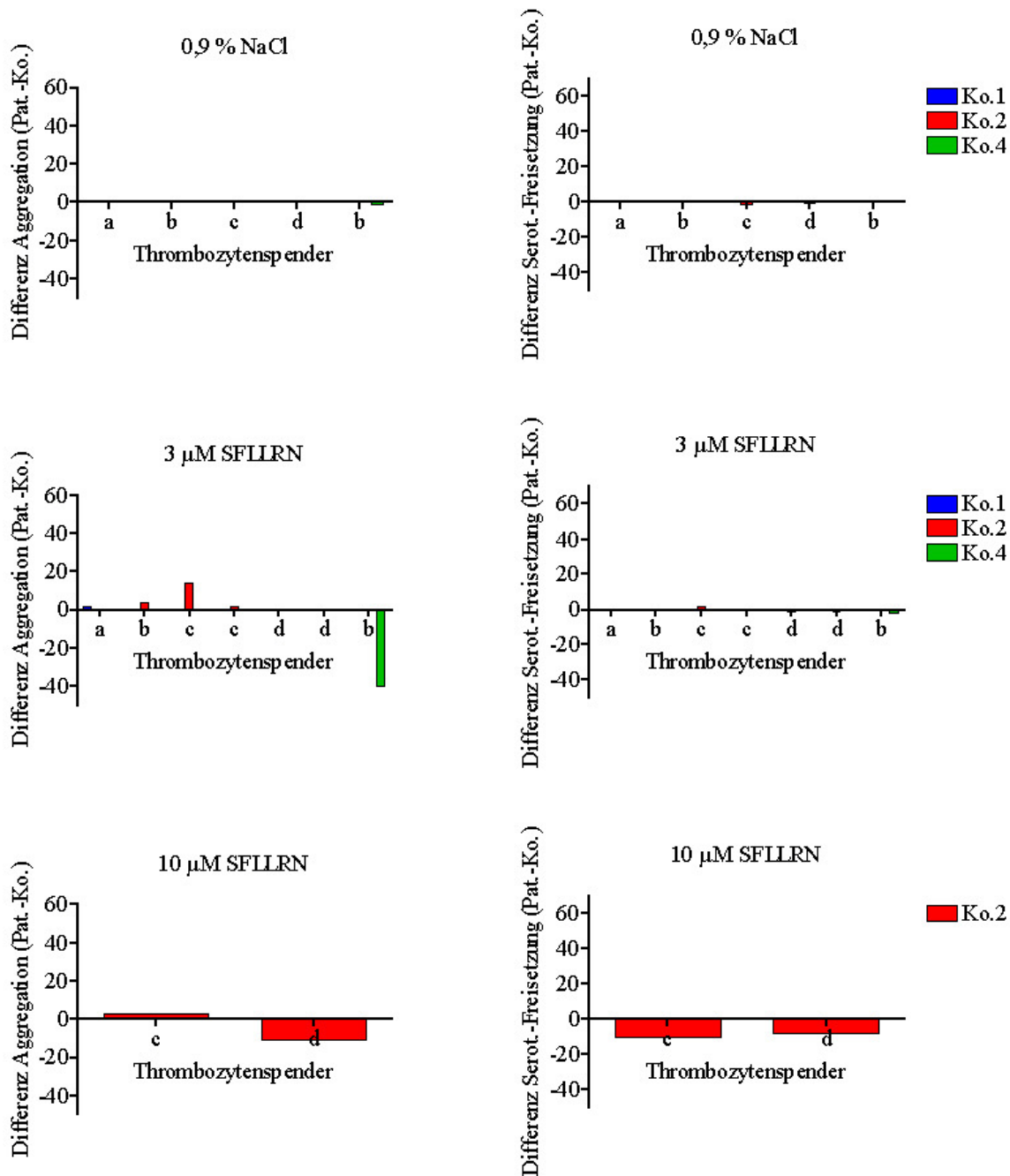


Abb. 28: Vergleich des Antikörperpräparats von Patient 3 mit Präparaten von Kontrollpersonen im Einfluss auf Thrombozyten-Aggregation und –Serotonin-Freisetzung unter Verwendung unterschiedlicher Thrombozytenspender

Patient 4

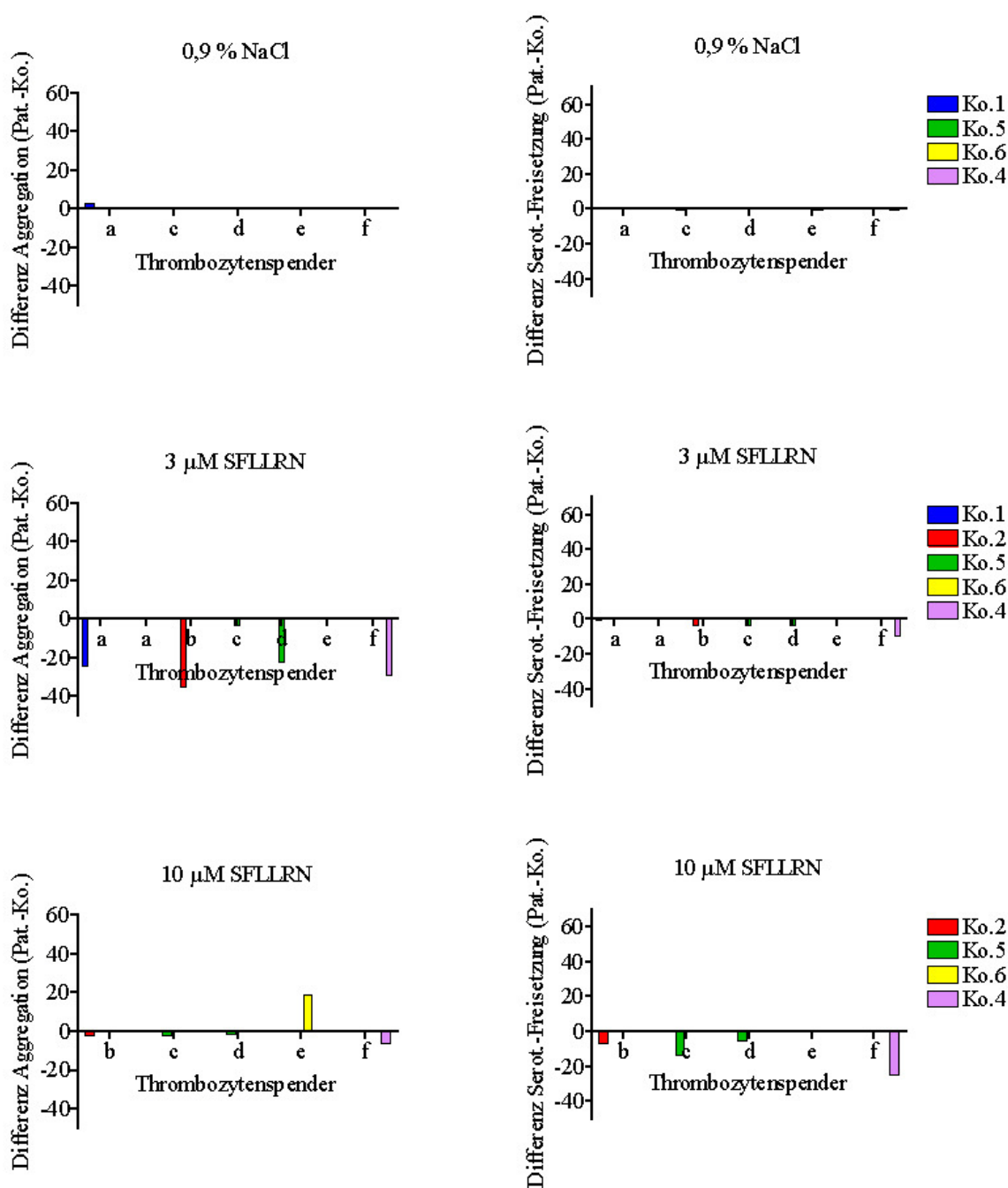


Abb. 29: Vergleich des Antikörperpräparats von Patient 4 mit Präparaten von Kontrollpersonen im Einfluss auf Thrombozyten-Aggregation und -Serotonin-Freisetzung unter Verwendung unterschiedlicher Thrombozytenspender

3. Ergebnisse

Patient 5

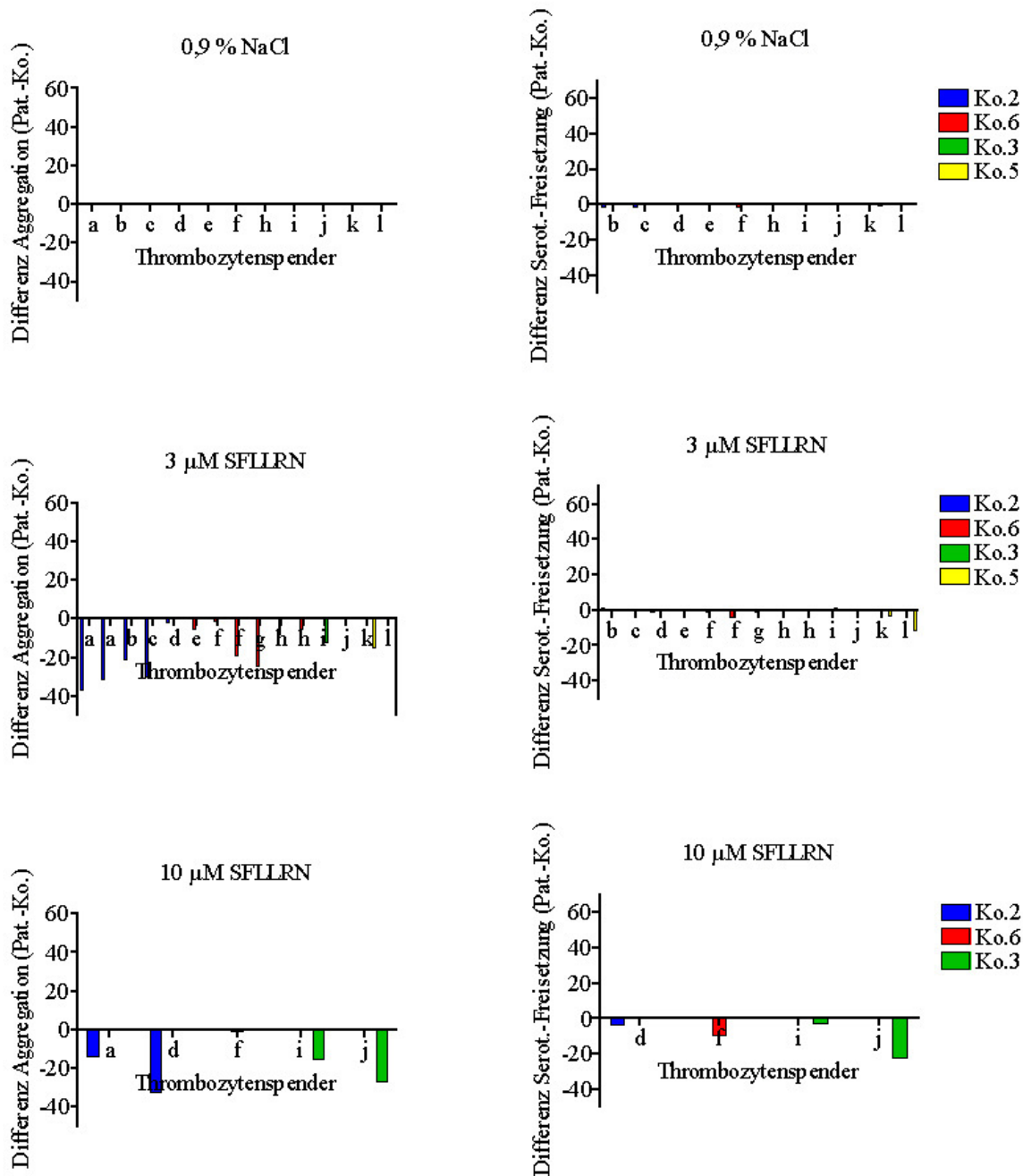


Abb. 30: Vergleich des Antikörperpräparats von Patient 5 mit Präparaten von Kontrollpersonen im Einfluss auf Thrombozyten-Aggregation und –Serotonin-Freisetzung unter Verwendung unterschiedlicher Thrombozytenspender

3.3.4 Einfluss von Patienten-IgG auf vorstimulierte Thrombozyten

Es sollte geprüft werden, ob mit nur 1 μM SFLLRN-Peptid für 15 min vorstimulierte Thrombozyten (Kontrolle erhielt 0,9 % NaCl) sensibler auf Autoantikörper-enthaltendes IgG reagierten. Nach der Vorstimulation der Thrombozyten erfolgte die 30-minütige Vorinkubation mit den Antikörper-Präparaten. Dazu wurde die Thrombozytensuspension aufgeteilt: Ein Teil wurde mit Patienten-IgG und ein Teil mit Kontroll-IgG vorinkubiert. Anschließend wurde jeweils die Aggregation nach Stimulation mit der mittleren Peptidkonzentration von 3 μM gemessen (Abb. 31).

Verglichen mit den Mittelwerten aus 3.3.2 (bei 3 μM SFLLRN Aggregation $51,0 \% \pm 4,7 \%$; Slope $23,4 \pm 0,8$; siehe Abb. 25) lagen die hier ermittelten Werte deutlich tiefer (Aggregation $9,3 \% \pm 3,2 \%$; Slope $5,8 \pm 1,9$). Die Berechnungen der Signifikanz nach Mann-Whitney ergaben für die Aggregation $p=0,0008$ und für den Slope $p=0,0005$. Diese Diskrepanz konnte sich aus der zusätzlichen Zeit für die Vorstimulation ergeben. Unter den gegebenen artifiziellen Bedingungen sinkt die Funktionalität der Thrombozyten mit fortschreitender Zeit.

Unabhängig vom IgG-Präparat bewirkte die Vorstimulation in 9 von 12 Fällen eine Erhöhung der Aggregation (+1 bis +7 %) bzw. Slope-Werte (+3 bis +9) im Vergleich zu den Proben ohne Vorstimulation nach Zugabe von 0,9 % NaCl.

Die mit 3 μM SFLLRN stimulierte Aggregation und einhergehend auch der Slope bei Kontrolle 2 waren ohne Vorstimulation deutlich höher als mit Vorstimulation. Dies könnte auf eine sensiblere Reaktion der hier verwendeten Spenderthrombozyten auf das Peptid zurückzuführen sein. Dabei war anzunehmen, dass die Thrombozyten nach Vorstimulation mit 1 μM SFLLRN bereits zu stark aktiviert waren, um eine erneute Reaktion auf 3 μM SFLLRN zu zeigen.

Die verwendeten Thrombozyten in diesem Versuch stammten von drei Spendern. Jeweils dieselben Thrombozytenpräparate wurden benutzt für die Gruppe „Kontrolle 1 und Patient 4“, für die Gruppe „Kontrolle 2 und Patient 4“ und für die Gruppe „Kontrolle 5 und Patient 5“. Werden die vorstimulierten Thrombozyten innerhalb jeder dieser drei Gruppen verglichen, so wurden in den ersten beiden nach Zugabe von sowohl 0,9 % NaCl als auch 3 μM SFLLRN höhere Werte gemessen mit Patienten-IgG als mit Kontroll-IgG (Differenzen bei Aggregation +3 % bzw. +7 %, beim Slope +5 bzw. +3). In der dritten Gruppe trifft das nicht zu (Differenz Aggregation -7 %, Slope -2).

Ein Vergleich der nicht vorstimulierten Thrombozyten innerhalb jeder Gruppe zeigte, dass die Thrombozytenfunktion mit Patienten-IgG eher abnahm. Bei Zugabe von 0,9 % NaCl betrugen die Unterschiede zum Kontroll-IgG bei der Aggregation $\pm 0 \%$, $\pm 0 \%$ bzw. -2 %, beim Slope -4, ± 0 und -9. Bei Stimulation mit 3 μM SFLLRN betrugen die Unterschiede bei der Aggregation $\pm 0 \%$, -35 % (siehe oben) bzw. -2 %, beim Slope -5, -2, bzw. -8.

3. Ergebnisse

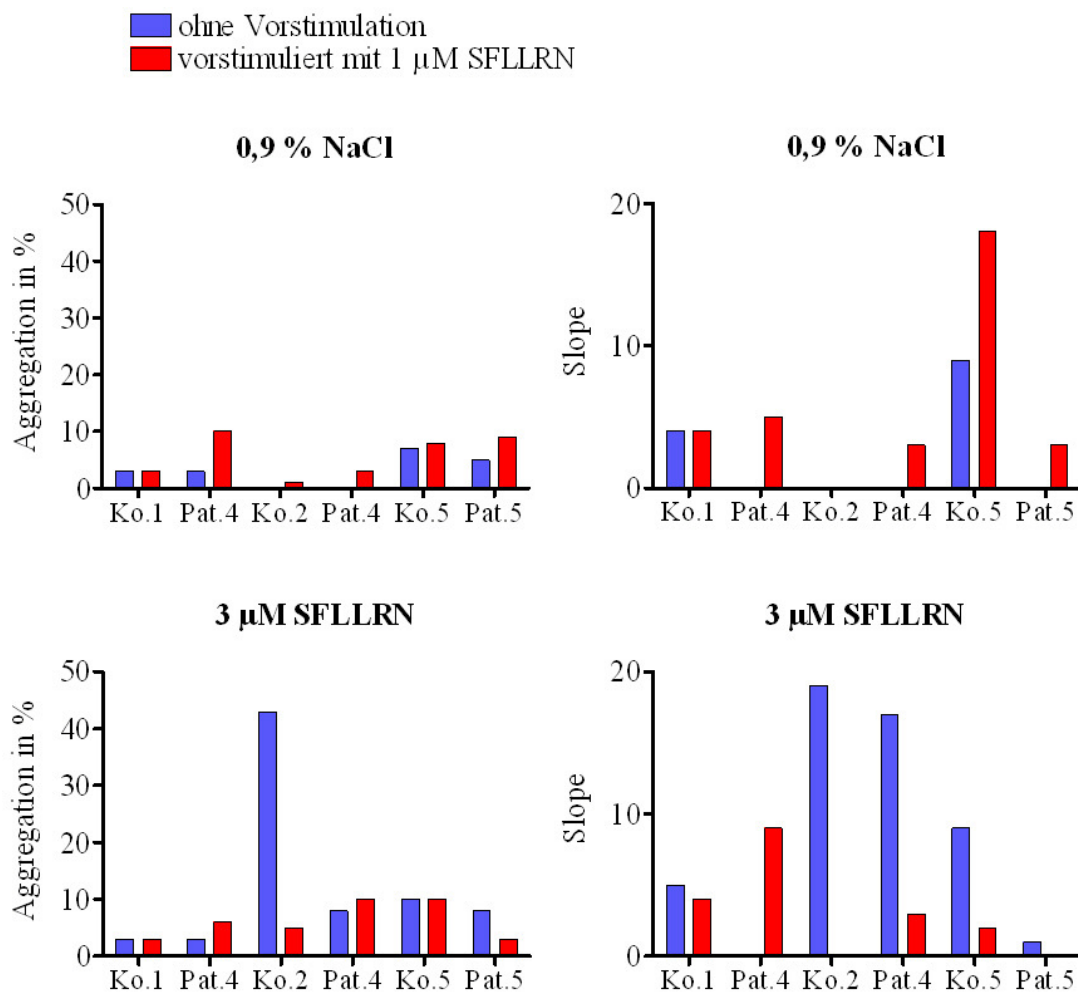


Abb. 31: Wirkung von Antikörperpräparaten auf vorstimulierte Thrombozyten. Es wurden drei verschiedene Thrombozytensuspensionen verwendet, jeweils dieselbe für Ko. 1 und Pat. 4, für Ko. 2 und Pat. 4 bzw. für Ko. 5 und Pat. 5. Fehlende Säulen entsprechen dem Wert 0.

3.4 Untersuchungen an humanen Monozyten

3.4.1 Reinheit der Monozytenpräparation

Mittels FACS-Analyse sollte stichprobenartig überprüft werden, wie rein die Monozytenpräparation war. Dazu wurden die zellulären Oberflächenrezeptoren HLA-DR und CD14 mittels Fluoreszenz-Farbstoff-konjugierter Antikörper markiert. Das kombinierte Auftreten dieser beiden Rezeptoren ist charakteristisch für Monozyten. Der Anteil von HLA-DR- und CD14-positiven Zellen in der Monozytensuspension lag bei $72,3 \% \pm 1,2$

(Abb. 32). Innerhalb des Gates, das über die vermutete Monozytenpopulation gesetzt wurde, lag der Anteil bei $89,4 \% \pm 0,6$.

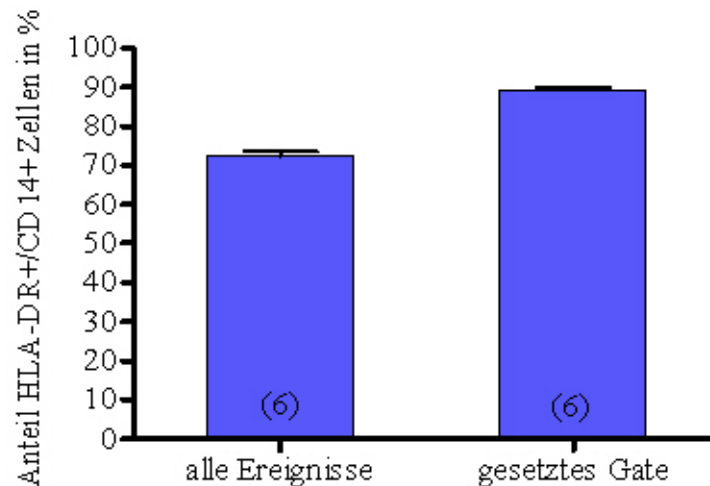


Abb. 32: Anteil von HLA-DR+/CD14+ Zellen in Monozytenpräparationen, ermittelt durch Messungen am FACS.

3.4.2 Methodenetablierung zur Messung von Sauerstoffradikalen aus Monozyten

Frisch isolierte Monozyten wurden mit 800 nM PMA zur Freisetzung von Sauerstoff-Radikalen angeregt. Die Farbstoffe Lucigenin und das Luciferinderivat MCLA wurden in ihrer Lumineszenz-Intensität verglichen. Dazu wurden die Konzentrationen von 5 μM und 25 μM für Lucigenin und 10 μM für MCLA verwendet. In Abb. 33 sind die Lumineszenz-Signale ohne Zellen, von 50.000 und von 500.000 Zellen pro Well in Abhängigkeit von der Zeit wiedergegeben. Unter den gegebenen Bedingungen konnte mit Lucigenin kein Lumineszenzsignal gemessen werden. Mit 10 μM MCLA und 500.000 Zellen erreichte die Kurve nach 10 min ein Maximum von 3,2 RLU.

3. Ergebnisse

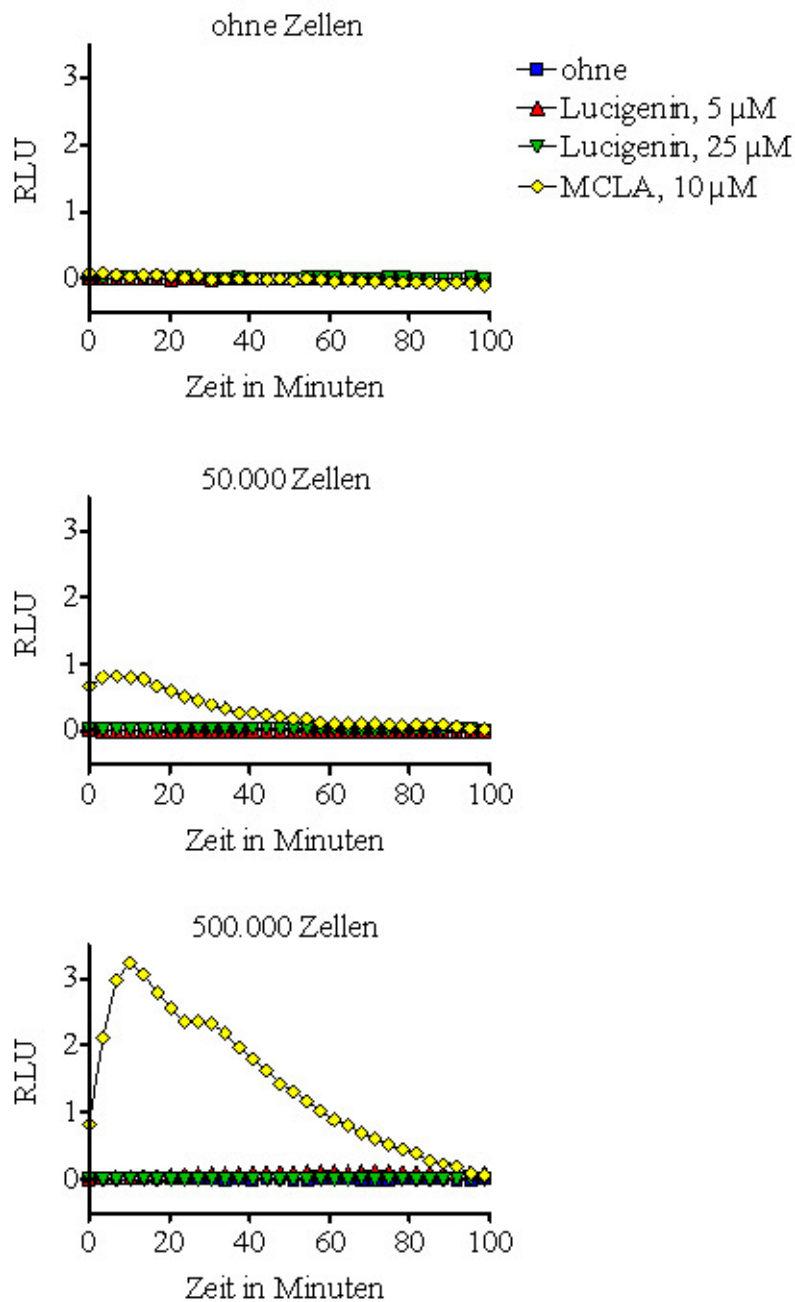


Abb. 33: Vergleich der Lumineszenz-Intensität von Lucigenin und MCLA. Monozyten wurden mit 800 nM PMA zur Bildung von Sauerstoffradikalen angeregt. Von jedem Messwert wurde der Wert ohne PMA subtrahiert. (n=1, Doppelbestimmung)

Zur Optimierung der MCLA-Konzentration wurde der Bereich von 1 µM bis 50 µM näher untersucht. Außerdem wurden unterschiedliche Zellzahlen getestet (100.000 bis 500.000 Monozyten pro Well). Die Ergebnisse sind in Abb. 34 dargestellt. Mit steigender MCLA-Konzentration sank das maximale Lumineszenz-Signal, welches jedoch von 1 µM bis 10 µM immer später erreicht wurde. Dafür hielt das Signal mit steigender MCLA-

Konzentration länger an. Je mehr Zellen verwendet wurden, desto stärker wurde das Lumineszenz-Signal und desto kürzer war das Kurvenplateau. In den folgenden Versuchen wurden 300.000 Zellen und 5 μM MCLA eingesetzt.

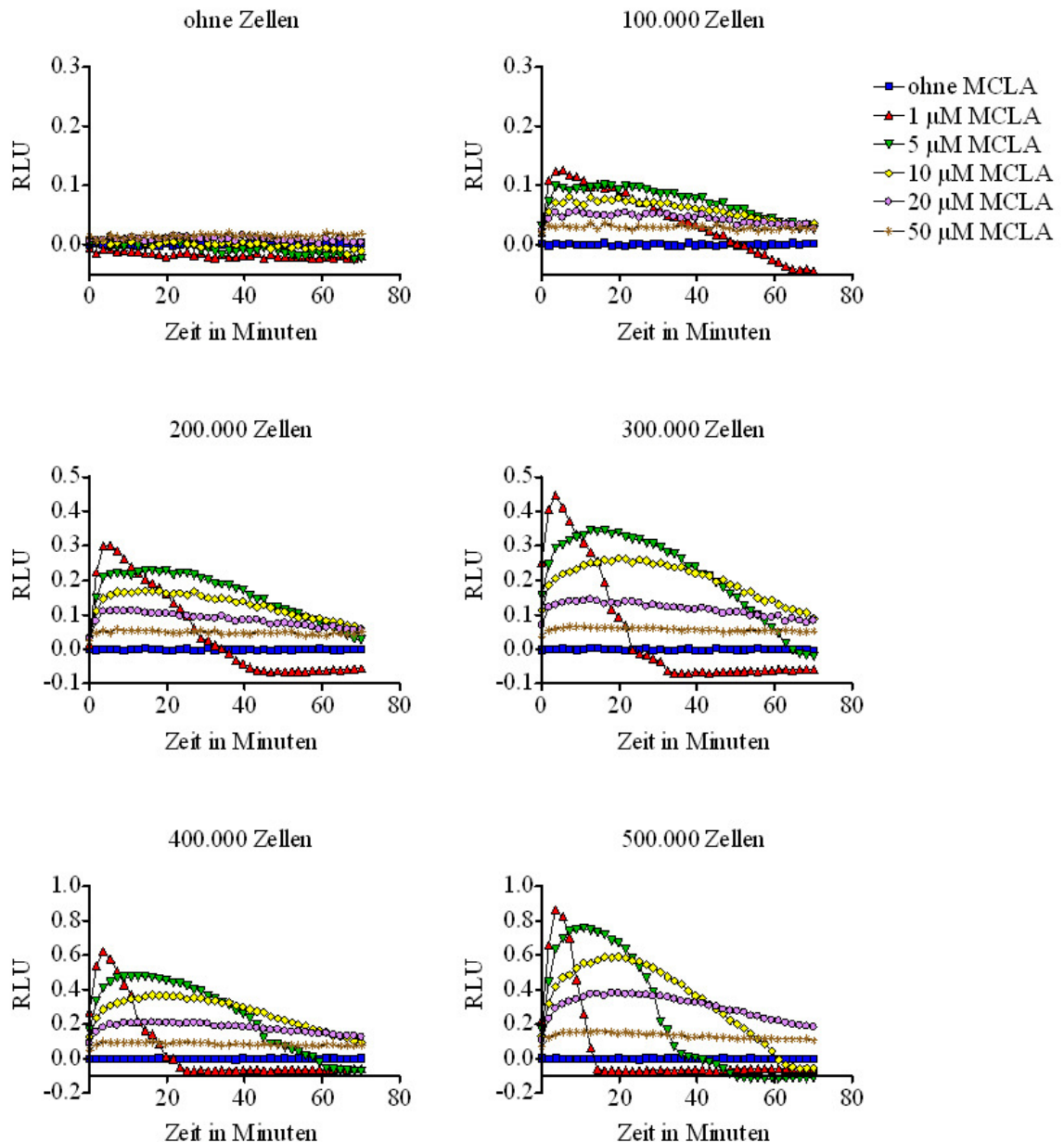


Abb. 34: Abhängigkeit des Lumineszenz-Signals von MCLA-Konzentration und Zellzahl. Monozyten wurden mit 800 nM PMA zur Bildung von Sauerstoffradikalen angeregt. Von jedem Messwert wurde der Wert ohne PMA subtrahiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Versuchen (maximaler SEM-Wert 0,16).

Des Weiteren wurde untersucht, ob die Zeit der Vorinkubation der Monozyten mit präparierten Antikörpern die Bildung von Sauerstoffradikalen beeinflusst. Die Funktion der isolierten Monozyten konnte mit der Zeit beeinträchtigt sein, ebenso konnte sie aber auch

3. Ergebnisse

durch Rehabilitation während der Ruhephase verbessert sein. Außerdem konnten Faktoren der Antikörpersuspension akute Effekte zeigen, die nach einer einstündigen Vorinkubation nicht mehr messbar wären. Die Monozyten wurden nicht oder für eine Stunde mit den Antikörperpräparationen eines Patienten oder einer Kontrollperson vorinkubiert. PMA wurde in den Konzentrationen 80 nM oder 800 nM zugegeben. Es wurden mehr Sauerstoffradikale nachgewiesen nach einstündiger Vorinkubation als ohne, auch ohne Zusatz von PMA (Abb. 35). Das Lumineszenz-Signal war bei 800 nM PMA am höchsten und erreichte das Plateau am frühesten. Ein qualitativer Unterschied zwischen Patient und Kontrollperson war dabei nicht erkennbar. Quantitativ lagen die Kurvenmaxima beim Patienten ein wenig über denen der Kontrollperson (Differenzen zwischen 0,01 und 0,05 RLU).

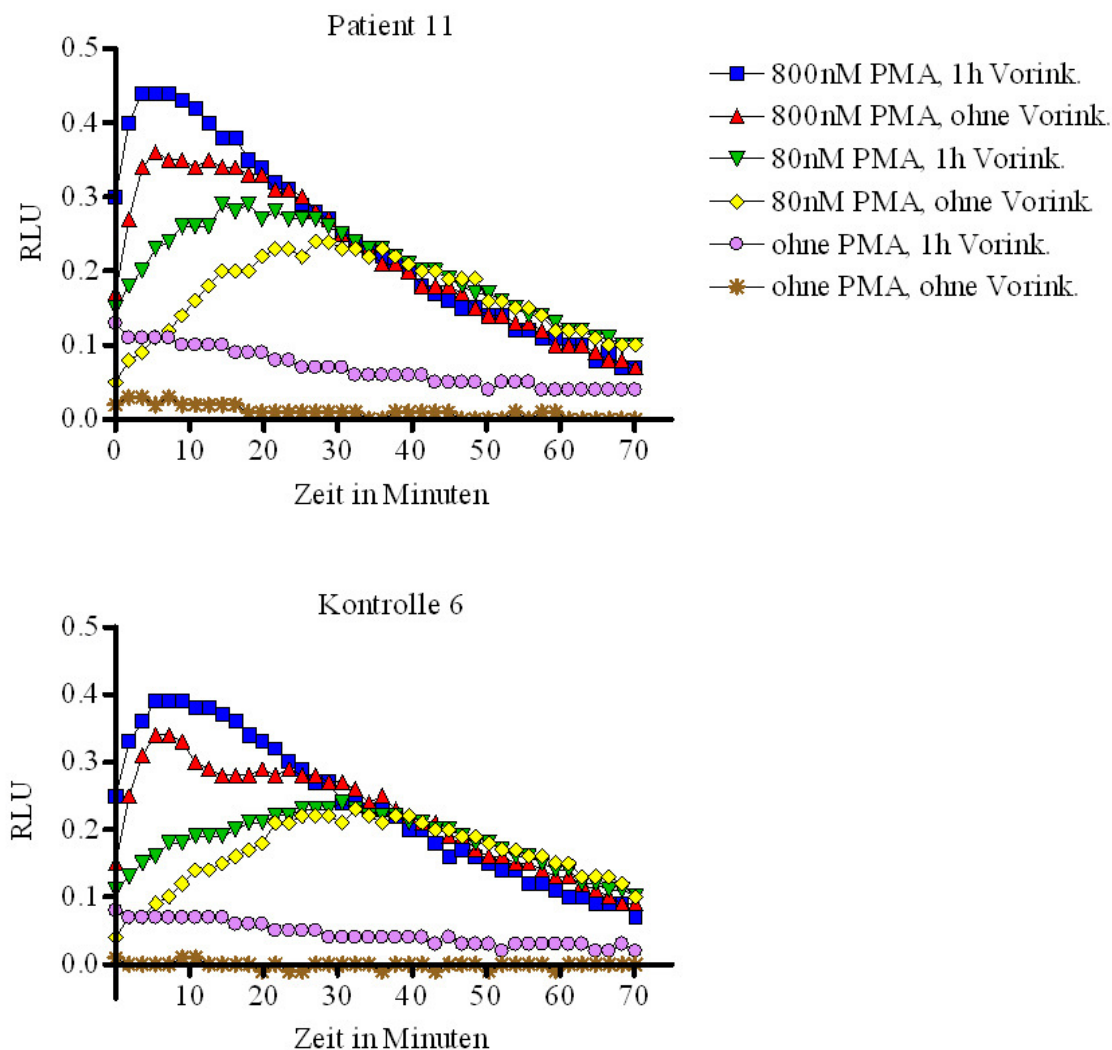


Abb. 35: Superoxidanion-Messung von PMA-stimulierten Monozyten mit und ohne Vorinkubation für 1 h mit IgG von Patient 11 bzw. Kontrolle 6

3.4.3 Einfluss von Antikörper-Präparaten auf die Freisetzung von Sauerstoffradikalen

In drei Versuchen wurde der Einfluss von Antikörper-Präparaten auf die Freisetzung von Sauerstoffradikalen aus Monozyten untersucht. Es wurden unterschiedliche PMA-Konzentrationen (0,8 nM - 800 nM) verwendet. Die Monozyten wurden vor der Zugabe von PMA mit den Antikörper-Präparaten 1 h lang vorinkubiert. Abb. 36 fasst die Ergebnisse zusammen. Die Kurvenverläufe spiegeln lediglich die jeweilige PMA-Konzentration wider. Ein genereller Unterschied zwischen Kontrollen und Patienten konnte nicht festgestellt werden.

3. Ergebnisse

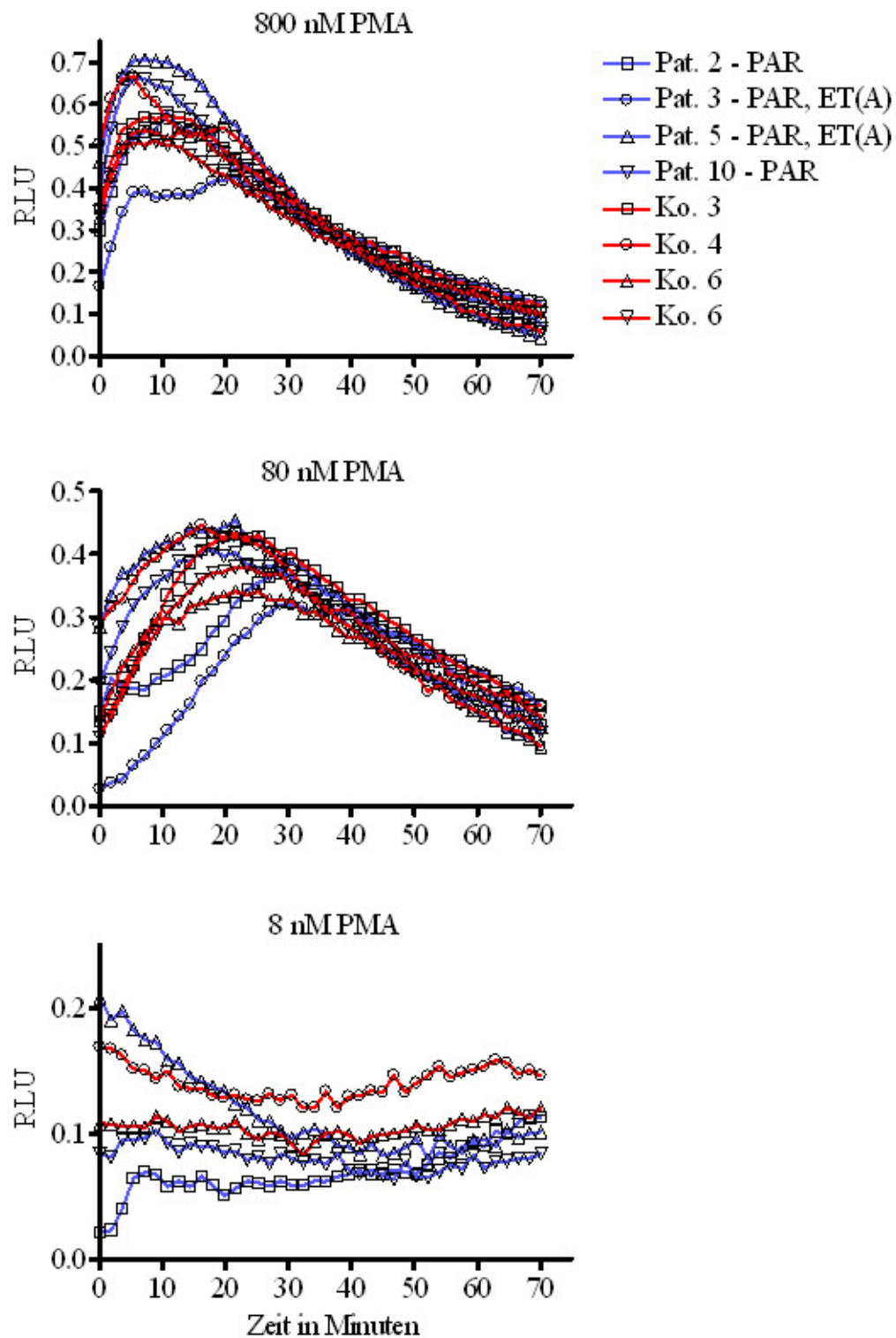


Abb. 36: Sauerstoffradikal-Bildung von PMA-stimulierten Monozyten nach einstündiger Vorinkubation mit IgG von Patienten bzw. Kontrollen

3.4.4 Quantifizierung von Tissue Factor und pERK1/2 in Monozyten mittels Western-Blot nach Stimulation mit Endothelin-1 oder Thrombin

Der Einfluss von Endothelin-1 (10 nM) und Thrombin (1 E/ml) auf die Produktion von TF (*tissue factor*) und die Aktivierung der MAPK ERK1/2 in serumhaltigem Medium wurde in drei Versuchen analysiert (Abb. 37). Die Monozyten wurden mit den Stimulanzen bzw. A. dest. als Kontrolle 2 h inkubiert. Die Werte wurden auf die Kontrolle=1 umgerechnet. Die Streuung der Messergebnisse war zu groß, um eine eindeutige Aussage zum Einfluss der beiden Stimulanzen treffen zu können.

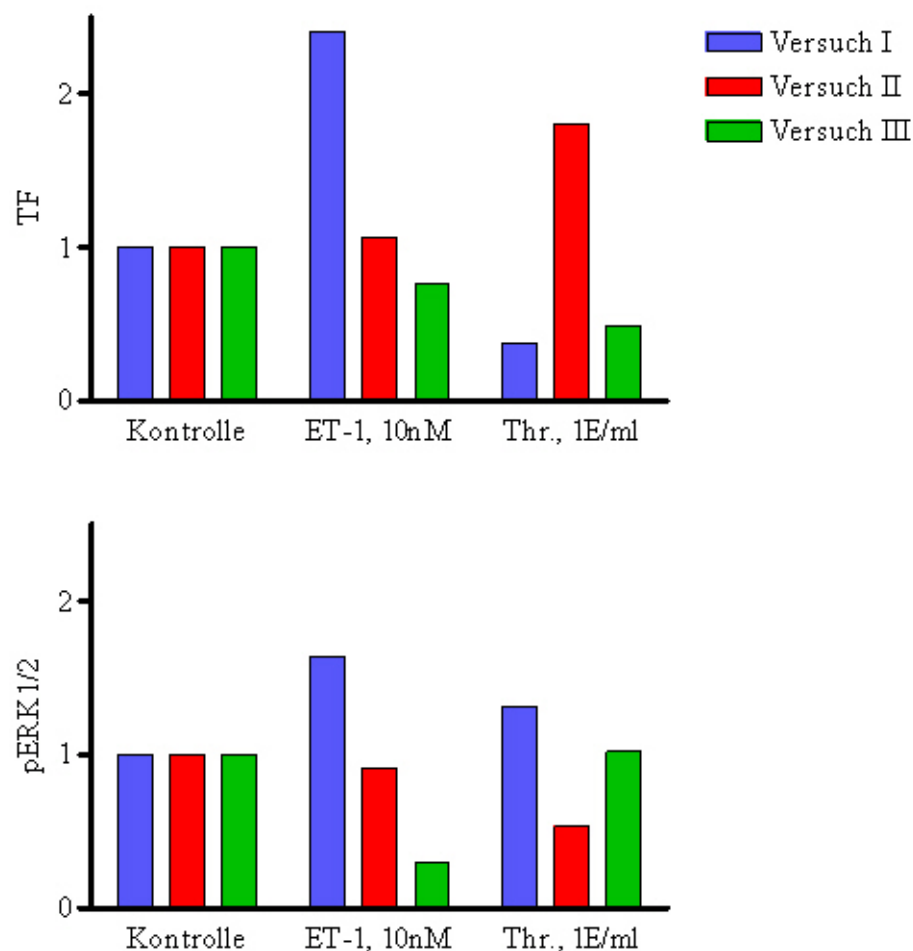


Abb. 37: Quantifizierung TF und pERK1/2 in Monozyten nach Stimulation mit Endothelin-1 oder Thrombin

3. Ergebnisse

3.4.5 Quantifizierung von Tissue Factor und pERK1/2 in Monozyten mittels Western-Blot nach Stimulation mit Antikörper-Präparaten

Mit IgG von Kontrolle 3 wurde die intraindividuelle Streuung der Messergebnisse untersucht (Abb. 38). In vier unabhängigen Versuchen zeigten sich nach 2 h einmal eine TF-Erhöhung (2,86-faches der Negativkontrolle) und einmal eine ERK1/2-Aktivierung (8,30-faches der Negativkontrolle). Die restlichen Ergebnisse unterschieden sich nicht deutlich von der Negativkontrolle. Die monozytäre Expression von TF und die Aktivierung von ERK1/2 sind demnach je nach Herkunft der Monozyten unterschiedlich.

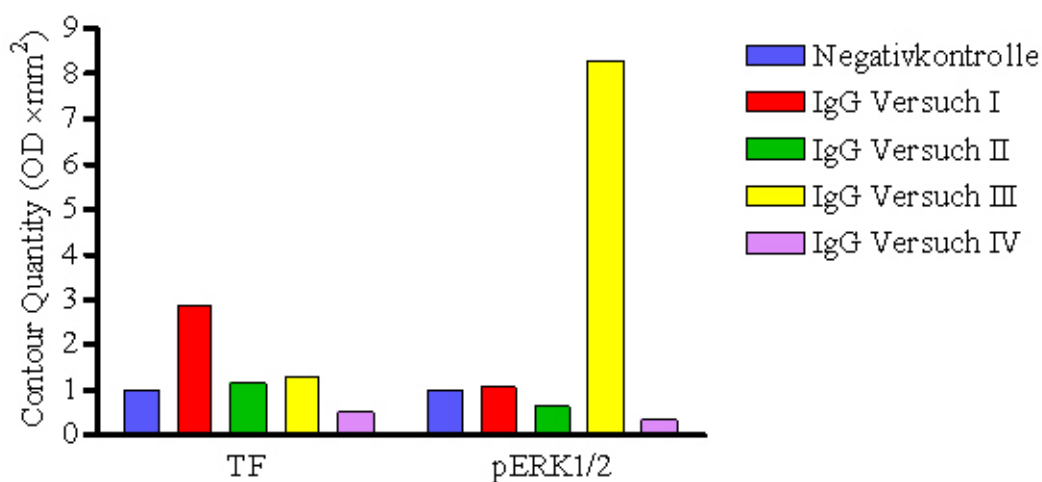


Abb. 38: Quantifizierung von TF und pERK1/2 in Monozyten nach Stimulation mit IgG von Kontrolle 3. Die Werte wurden normiert, so dass die Negativkontrolle (A. dest.)=1 ist.

Es wurden Antikörper-Präparate von fünf Kontroll- und von fünf Patientenseren im Hinblick auf eine veränderte Produktion von TF und pERK1/2 getestet. Die Monozyten wurden 2 h mit den IgG-Präparaten inkubiert. In Abb. 39 sind die Ergebnisse zusammengefasst. Im Falle von TF ergaben die Kontrollen Werte zwischen dem 1,5- und 6,0-fachem der Negativkontrolle, die Patienten zwischen dem 1,1- und 2,8-fachem. Für pERK1/2 ergab sich eine Spanne vom 1,1- bis 2,6-fachem der Negativkontrolle bei den Kontroll-IgGs und Werte vom 0,8- bis 12,2-fachem bei den Patienten-IgGs. Die Messwerte von Patient 10 (12,2) und Patient 11 (9,4) unterschieden sich hierbei deutlich von den anderen Patienten und Kontrollen. Eine zusammenfassende Aussage über den Einfluss von Patienten-IgG auf die Produktion von TF und pERK1/2 bei Monozyten im Vergleich zu Kontroll-IgG ließ sich damit nicht treffen.

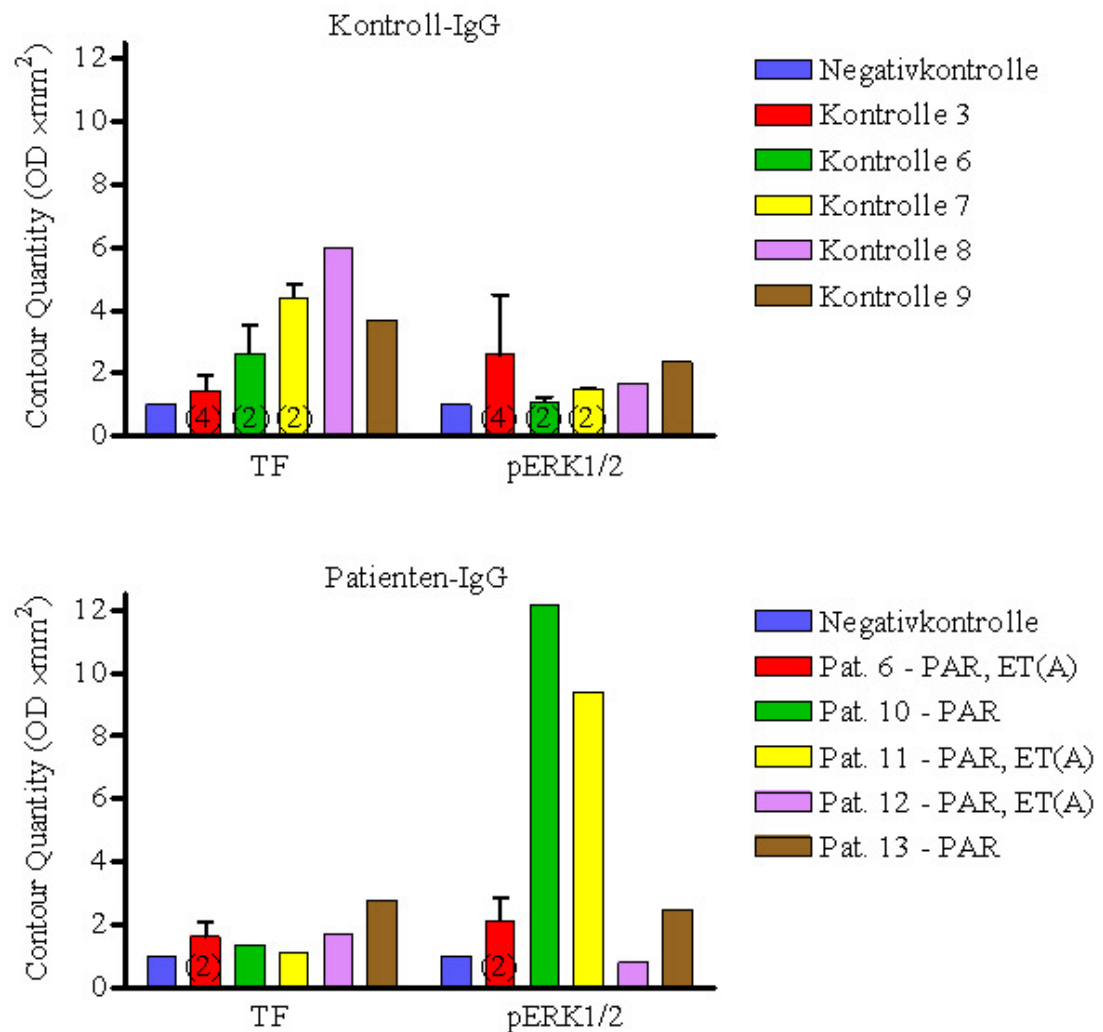


Abb. 39: Quantifizierung von TF und pERK1/2 in Monozyten nach Stimulation mit IgG von fünf Kontrollen und sechs Patienten. Die Werte wurden normiert, so dass die Negativkontrolle (A. dest.)=1 ist.

Des Weiteren wurde untersucht, ob Eluat und Durchfluss affinitätschromatografisch aufgereinigter PAR-Autoantikörper eine unterschiedliche monozytäre Aktivierung von TF-Produktion bzw. ERK1/2 bewirken. Der Durchfluss sollte eine direkte Negativkontrolle zum Eluat darstellen. Der Versuch wurde unter Verwendung eines einzigen Monozyten-Präparats durchgeführt. Wie in Abb. 40 gezeigt, bewirkten die Durchfluss-Präparate von Patient 14a [ET(A)] und Patient 15a (keine Autoantikörper) wie auch das Eluat von Patient 15a eine Erhöhung des TF-Proteins, nicht jedoch das Eluat von Patient 14a (PAR). ERK1/2 wurde bei Stimulation mit beiden Durchfluss-Präparaten verstärkt phosphoryliert. Die Eluate (PAR) lieferten hier Ergebnisse vergleichbar mit der Negativkontrolle.

3. Ergebnisse

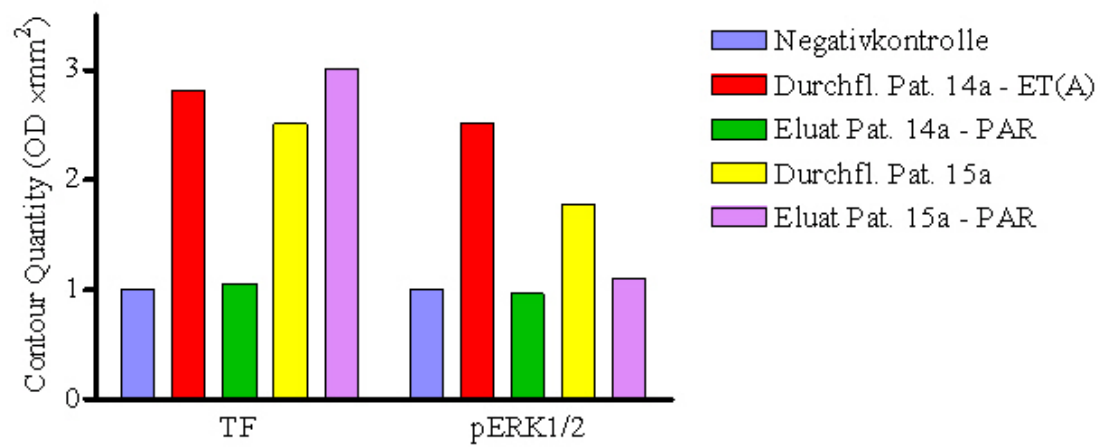


Abb. 40: Quantifizierung von TF und pERK1/2 in Monozyten nach Stimulation mit Eluat bzw. Durchfluss affinitätschromatografisch aufgereinigter Antikörper-Präparationen von zwei Patienten. Die Werte wurden normiert, so dass die Negativkontrolle (A. dest.)=1 ist.

4 Diskussion

4.1 Funktion von Ventrikel-Kardiomyozyten neonataler Ratten

4.1.1 Nachweis und Charakterisierung von Autoantikörpern anhand der Pulsationsrate von Kardiomyozyten bei Stimulation mit Patienten-Immunglobulin

In dieser Arbeit konnten Autoantikörper gegen die Protease-aktivierten Rezeptoren 1 und 2 (PAR1/2) und gegen den Endothelin-Rezeptor ET(A) in Seren von Patienten mit Raynaud-Syndrom oder Herz-Kreislauf-Erkrankungen nachgewiesen werden. In einer Stichprobe von 32 Patienten mit Raynaud-Syndrom enthielten 87,5 % der Patientenserum Antikörper gegen die Rezeptoren PAR1/2 und/oder ET(A). Mit einem Anteil von 46,9 % enthielten die meisten der untersuchten Seren Autoantikörper gegen die Rezeptoren PAR1/2, aber auch die Kombination dieser mit Autoantikörpern gegen den Rezeptor ET(A) war mit 37,5 % relativ häufig. Die PAR1/2-spezifischen Autoantikörper wirkten auf spontan pulsierende Ratten-Kardiomyozyten dosisabhängig positiv chronotrop, ebenso wie die Agonisten Thrombin und das PAR1/2-stimulatorische Peptid SFLLRN. Die funktionellen Effekte der PAR1/2-Autoantikörper sowie der PAR-Agonisten konnten durch das Thrombin-Rezeptor-inhibitorische Peptid YFLLRN geblockt werden [122]. Die Spezifität der Autoantikörper gegen Loop II von PAR1 und PAR2 wurde durch Neutralisierung der Antikörper mit den entsprechenden Peptiden nachgewiesen. Da beide PAR-Autoantikörper-neutralisierenden Peptide einen Abschnitt gleicher Aminosäuresequenz enthalten, kann darin das Epitop der Antikörper vermutet werden. Es kann angenommen werden, dass die PAR-Autoantikörper beide Rezeptorsubtypen, PAR1 und PAR2, erkennen und aktivieren.

Die Autoantikörper gegen den Endothelin-Rezeptor ET(A) wirkten wie Endothelin-1 dosisabhängig negativ chronotrop. Die Spezifität für den Rezeptor-Subtyp ET(A) konnte durch den antagonistischen Effekt des ET(A)-Blockers BQ610 nachgewiesen werden. Der Inhibitor des ET(B)-Rezeptors BQ788 hatte keinen Einfluss auf den negativ chronotropen Effekt des Endothelins und der ET(A)-Rezeptor-Autoantikörper [124].

Das Raynaud-Syndrom zeichnet sich durch meistens Kälte-induzierte vasospastische Anfälle in den Akren (hauptsächlich Finger) aus (siehe 1.2.1). Die Symptome der Urtikaria sind Histamin-vermittelt, setzen also eine Aktivierung des Immunsystems voraus (siehe 1.2.2). Herz-Kreislauf-Erkrankungen wie die koronare Herzkrankheit oder Angina pectoris stellen Durchblutungsstörungen der koronaren Gefäße dar (siehe 1.2.3). Veränderungen der Pulmonalarterien können zum schweren Krankheitsbild der pulmonalen Hypertonie führen (siehe 1.2.4). Bei all diesen Erkrankungen spielen Wechselwirkungen zwischen aktivierten Immunzellen, Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen eine bedeutende Rolle – Zellen, die auch die Rezeptoren PAR1, PAR2 und ET(A) exprimieren. Eine Autoantikörper-induzierte

4. Diskussion

Aktivierung dieser Rezeptoren könnte das Endothel aktivieren und proinflammatorische Effekte wie die Adhäsion und Penetration von Immunzellen, die Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren und die Aktivierung von Thrombozyten hervorrufen. Durch Endothelin oder Thrombin aktivierte glatte Gefäßmuskelzellen führen zur Vasokonstriktion [87,111]. Eine pathophysiologische Rolle der funktionellen Autoantikörper gegen PAR1/2 und ET(A) bei Gefäßerkrankungen kann daher nicht ausgeschlossen werden. Untersuchungen zur Funktionalität der Autoantikörper an Zellen des Immun- und Herz-Kreislauf-Systems sind nötig, um eine mögliche Pathogenizität dieser Autoantikörper zu beurteilen.

Bei 80 % der Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie kommen Autoantikörper gegen den β_1 -adrenergen Rezeptor vor [21]. Erste Studien zur Immunadsorption an solchen Patienten konnten den Erfolg dieser Behandlung aufzeigen (siehe 1.1.3 [15,16,17]). Bei der Immunadsorption werden Immunglobuline aus dem Plasma der Patienten entfernt und durch ein therapeutisches Immunglobulin-Präparat ersetzt. Bei der Plasmapherese hingegen wird das Blutplasma des Patienten ausgetauscht. Dragun et al. beschreibt eine solche Behandlung an Patienten mit refraktärer Nierentransplantat-Abstoßung [18]. Von diesen Patienten hatten einige Spender-spezifische HLA-Antikörper und andere Patienten hatten Autoantikörper gegen den G-Protein-gekoppelten Angiotensin II-Rezeptor AT_1 . Diese Beispiele deuten auf eine mögliche Pathogenizität von Autoantikörpern gegen die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren β_1 und AT_1 .

4.1.2 Einfluss von Serum auf die Aktivierung von ERK1/2 und die Expression von $p67^{\text{phox}}$ durch Stimulanzen

Die Methode der Pulsationsraten-Bestimmung von Kardiomyozyten ist für das serumhaltige System etabliert [127]. Zellkulturmedien ohne Serum werden im Allgemeinen als Mangelmedien bezeichnet, denn es fehlen Nährstoffe und Wachstumsfaktoren. Serum wird aus Blut gewonnen durch Aktivierung der Blutgerinnung und Abtrennung der koagulierten Zellen und des Fibrins. In der Zellkultur wird hitzeinaktiviertes Serum verwendet, d.h. Proteine wie z.B. Komplementfaktoren und Enzyme sind inaktiviert. Solches Serum ist also eine modifizierte Form des physiologischen Blutplasmas und ähnelt außerdem in der Zusammensetzung dem extrazellulären Milieu im Gewebe. Art und Konzentration der Inhaltsstoffe des Serums wie zum Beispiel Hormone, Zytokine oder Wachstumsfaktoren können zum Teil beträchtlich variieren je nach Spezies, Geschlecht, Alter oder sonstigem Zustand des Individuums. Auch exogene Faktoren wie Medikamente oder Bestandteile aus der Nahrung tragen dazu bei, dass unterschiedliche Serum-Chargen unterschiedliche Bedingungen darstellen.

Viele In-vitro-Versuche mit Zellen in Kultur werden in serumfreiem Medium durchgeführt. Dazu wird das serumhaltige Kulturmedium einen Tag oder einige Stunden vor dem Versuch entfernt, die Zellen werden mit PBS gewaschen und erhalten dann serumfreies Medium. Dies soll verhindern, dass die oben genannten variablen Faktoren die Aussagekraft des Versuchsergebnisses beeinträchtigen. Damit wird aber auch von vornherein das Milieu der Zellen drastisch verändert.

Da auch die Pulsationsraten-Bestimmung im serumhaltigen System durchgeführt wurde, wurde diese Versuchsbedingung für die meisten Versuche in dieser Arbeit übernommen. Am

Beispiel der Aktivierung von ERK1/2 und der Expression von p67^{phox} in neonatalen Ratten-Kardiomyozyten sollte nun festgestellt werden, ob der Serumgehalt des Mediums einen Einfluss zeigt. Ohne Serum war die Aktivierung von ERK1/2 mit Endothelin-1 stärker als mit Serum. Im serumhaltigen System war die ERK1/2-Phosphorylierung mit Thrombin sogar auf dem gleichen Level wie die Kontrolle. Nur ohne Serum zeigte Thrombin hier einen leichten Effekt. Bei 24-stündiger Stimulation mit IL-1 β , IL-6 oder LPS bewirkte serumhaltiges Medium eine etwas stärkere Phosphorylierung von ERK1/2 als serumfreies. Die Expression von p67^{phox} in Medium ohne Serum war bei Stimulation mit SFLLRN niedriger als mit Serum. Alle anderen Ergebnisse erwiesen sich als unabhängig vom Serumgehalt des Kulturmediums.

Es ist möglich, dass Thrombin durch Faktoren im Serum inaktiviert wird. Antithrombin und Thrombomodulin sind physiologische Thrombin-Inhibitoren, aber auch Protease-Inhibitoren wie α_2 -Makroglobulin oder Heparin-Cofaktor II können hier eine Rolle spielen [128]. Endothelin-1 ist ein Peptid und kann ebenso wie das Peptid SFLLRN durch Proteasen oder Peptidasen leicht abgebaut werden. Wenn solche Faktoren im Serum durch Erwärmung auf 57°C nicht inaktiviert wurden, könnten sie die Verfügbarkeit der Stimulanzen reduzieren. Die Protease-Wirkung des Thrombins an den Rezeptoren PAR1/2 könnte außerdem im serumhaltigen Milieu herabgesetzt sein, weil Bestandteile des Serums zusätzliche Substrate darstellen können und somit weniger Thrombin für die enzymatische Reaktion an PAR1 und PAR2 zur Verfügung steht.

Andererseits hatte das Serum keinen Einfluss auf die Aktivierung von ERK1/2 durch SFLLRN. Außerdem bewirkte dieses Peptid in PRP eine stärkere Thrombozytenaggregation als bei gewaschenen Thrombozyten. Das legt nahe, dass kein nennenswerter Abbau des Peptids durch Serumbestandteile während der Versuchsdurchführung stattfand und die Aktivität des Peptids erhalten blieb. Eine Inaktivierung von Thrombin erscheint ebenso unplausibel für die fehlende Aktivierung von ERK1/2 im serumhaltigen Medium angesichts der positiv chronotropen Wirkung auf Kardiomyozyten.

Serumkomponenten mit inhibitorischer Wirkung auf die in dieser Arbeit verwendeten Stimulanzen sind nicht auszuschließen. Aber positive funktionelle Effekte in Anwesenheit von Serum bei einigen Methoden schließen eine generelle Inaktivierung der Stimulanzen aus. Abhängig vom jeweiligen Experiment kann der Serumgehalt des Mediums die Testergebnisse beeinflussen.

4.1.3 Agonisten Endothelin-1, Thrombin und Peptid SFLLRN

Kardiomyozyten exprimieren die Rezeptoren ET(A), PAR1 und PAR2. Die vorliegende Arbeit stützt sich auf die Erkenntnis, dass Autoantikörper gegen diese G-Protein-gekoppelten Rezeptoren die Pulsationsrate von neonatalen Ratten-Kardiomyozyten verändern. Die Antikörper gegen ET(A) wirken negativ chronotrop, die gegen PAR1/2 positiv chronotrop.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch Thrombin und SFLLRN die Pulsationsraten neonataler Ratten-Kardiomyozyten konzentrationsabhängig zunahmen. Der Effekt wurde durch das inhibitorische Peptid YFLLRN blockiert. Endothelin-1 induzierte dosisabhängig einen negativ chronotropen Effekt, der durch den ET(A)-Antagonisten BQ610 geblockt wurde.

4. Diskussion

Im serumfreien Medium zeigte Endothelin-1 eine deutliche Aktivierung von ERK1/2. Diese Befunde liegen in Übereinstimmung mit den Daten von Sugden und Clerk [106,106,128]. In Zellen, die in serumhaltigem Medium kultiviert wurden, war nur ein leichter Effekt nach 10 bis 30 min erkennbar. Thrombin aktivierte ERK1/2 ohne Serum nur geringfügig. Im serumhaltigen System erhöhte Thrombin die Phosphorylierung von ERK1/2 nicht. Demnach scheint Thrombin bei einer Aktivierung von ERK1/2 keine Rolle zu spielen. Das Peptid SFLLRN führte jedoch zu einer verstärkten Phosphorylierung von ERK1/2 nach 2 min. Da Thrombin den Rezeptor PAR1 aktiviert, das Peptid jedoch sowohl über PAR1 als auch über PAR2 seine Wirkung realisiert, könnte die Peptid-induzierte Aktivierung von ERK1/2 hier über PAR2 ausgelöst worden sein.

Im zeitlichen Verlauf bis 24 h schien der $p67^{\text{phox}}$ -Level leicht erhöht durch Stimulation mit dem Peptid SFLLRN. Thrombin und Endothelin-1 veränderten bis 24 h den $p67^{\text{phox}}$ -Level der Kardiomyozyten nicht. Diese Ergebnisse deuten also auf keine verstärkte Aktivität der NADPH-Oxidase in Kardiomyozyten durch PAR1- oder ET(A)-Agonisten. Eine Induktion über PAR2 kann jedoch nicht ausgeschlossen werden.

4.1.4 Proinflammatorische Faktoren IL-1 β , IL-6 und LPS

Das proinflammatorische Zytokin IL-1 β bewirkt Effekte an den meisten Zelltypen über den Rezeptor IL-1R_I (IL-1-Rezeptor Typ I) [129]. Kereveur et al. konnten zeigen, dass eine IL-1 β -Stimulation die Expression von TFPI (*tissue factor pathway inhibitor*) in Kardiomyozyten erhöht [130]. In einer Arbeit von Shindo et al. wurde die IL-1 β - oder LPS-induzierte Freisetzung von NO aus Kardiomyozyten beschrieben [131].

Die Familie der IL-6-Zytokine ist multifunktionell. Sie werden u.a. von Fibroblasten, Keratinozyten, Monozyten, T- und B-Lymphozyten produziert [132]. Der IL-6-Rezeptor (IL-6R) bildet in der Zellemembran einen Komplex mit gp130, welches das Signal überträgt [133]. IL-6 bewirkt an Kardiomyozyten eine verminderte Expression von SERCA (*sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase*) [134] und eine erhöhte Expression von ANP (*atrial natriuretic peptide*) und BNP (*B-type natriuretic peptide*) [135]. Einerseits wird IL-6 eine Rolle in der Depression der Herzkontraktilität, der Hypertrophie und Herzdysfunktion nach Ischämie zugewiesen, andererseits wirkt IL-6 in einem Ischämie-Reperusionsmodell mit neonatalen Ratten-Kardiomyozyten kardioprotektiv [136].

LPS (Lipopolysaccharid) ist der Hauptbestandteil der äußeren Membran (*outer membrane*) Gram-negativer Bakterien. Nach Komplexbildung mit dem Akute-Phase-Protein LBP (*LPS-binding protein*) induziert es proinflammatorische Immunantworten myeloider Zellen durch Aktivierung des LPS-Rezeptors TLR4 (*Toll-like-receptor 4*) [137]. Auch Kardiomyozyten exprimieren diesen Rezeptor. Der LPS-aktivierte TLR4 bewirkt eine Reduktion der Kontraktilität von Kardiomyozyten, wahrscheinlich indirekt über Mediatoren aus stimulierten Immunzellen im Herzen [138].

In dieser Arbeit wurde die Aktivierung der MAPK ERK1/2 sowie die Expression des $p67^{\text{phox}}$ -Proteins in Kardiomyozyten nach Stimulation mit IL-1 β , IL-6 und LPS untersucht. IL-1 β führte zu einer verstärkten ERK1/2-Phosphorylierung nach 5 und 20 min. LPS zeigte einen

deutlichen Effekt nach 20 min. IL-6 aktivierte ERK1/2 im getesteten Konzentrationsbereich nicht. Der p67^{phox}-Level wurde bis 24 h durch keines der Stimulanzen verändert.

Die Phosphorylierung von ERK1/2 durch LPS liegt im Widerspruch mit den Daten von Tavener et al., die keine Aktivierung einer MAPK in diesem Zelltyp nachweisen konnten [138]. Jedoch wird i. A. beschrieben, dass LPS in anderen Zelltypen die MAPK p38, JNK und ERK1/2 aktiviert [138]. Der hier gemessene Effekt könnte auf die Anwesenheit geringer Mengen Nicht-Muskelzellen in der Kultur zurückzuführen sein. Mastzellen zum Beispiel werden ebenfalls durch LPS aktiviert und die folgende Degranulation setzt u.a. Histamin, PAF (*platelet activating factor*) TNF α und Oxidanzien frei. Die ERK1/2-Aktivierung könnte sekundäre Effekte solcher Mediatoren widerspiegeln.

Eine ausführliche Darstellung der Signalkaskaden nach Aktivierung von TLR4 veröffentlichten Pålsson-McDermott und O'Neill (2004) [137]: Darin wird nur die Aktivierung der MAPK p38 und JNK aufgezeigt, nicht jedoch ERK1/2. Demnach können positive Ergebnisse zur ERK1/2-Aktivierung durch LPS in der vorliegenden Arbeit auch auf sekundäre Effekte zurückzuführen sein.

4.1.5 Einfluss von Autoantikörpern auf die Aktivierung von ERK1/2

Der Einfluss verschiedener Antikörper-Präparate auf die Aktivierung von ERK1/2 wurde überprüft. IgG-Präparate von Patienten mit Autoantikörper gegen PAR1/2 und der in Kaninchen generierte Autoantikörper gegen PAR2 zeigten den gleichen leicht aktivierenden Effekt wie das Peptid SFLLRN. Obwohl Endothelin-1 die stärkste ERK1/2-Aktivierung hervorrief, blieben die Werte mit Autoantikörpern gegen ET(A) nur wenig über denen der A. dest.-Kontrolle.

Bemerkenswert ist, dass das IgG von Kontrollpersonen stärkere Effekte zeigte als die IgG-Präparate mit Autoantikörper gegen die Rezeptoren PAR1/2 und ET(A). Das therapeutisch verwendete Endobulin hatte keinen Einfluss auf die Aktivierung dieser MAPK. Es bedarf deshalb einer Erklärung für die Wirkung des Kontroll-IgGs. In den Untersuchungen zur Pulsationsrate von Kardiomyozyten zeigten die Kontroll-IgGs keinen Effekt. Dieses wurde auf die gleiche Art präpariert wie das IgG der Patienten mit PAR1/2-Autoantikörpern. Eine Aktivierung von Zellen über Fc γ -Rezeptoren ist mit hoher Wahrscheinlichkeit auch auszuschließen, da das Endobulin keinen Einfluss auf die Phosphorylierung der MAPK ausübte.

Eine Coinkubation mit IL-1 β erhöhte in allen Fällen die Phosphorylierung von ERK1/2. Dieser Effekt blieb mit IL-6 oder LPS aus. Wie unter 4.1.4 erwähnt, erhöhte IL-1 β auch allein pERK1/2, aber auf einem niedrigeren Niveau. Es kann hier also von einem additiven, costimulatorischen Effekt ausgegangen werden. Dieses Ergebnis liefert einen Hinweis dafür, dass Autoantikörper gegen PAR1/2 oder ET(A) im inflammatorischen Gewebe mit erhöhtem Vorkommen von IL-1 β verstärkt wirksam werden können.

4.2 Funktion von hCASMCs

4.2.1 Agonisten Endothelin-1, Thrombin und Peptid SFLLRN

Endothelin-1 ließ nur eine leichte Aktivierung von ERK1/2 in kultivierten hCASMCs nach 20 min erkennen (1,8-faches der Kontrolle). Untersuchungen von Trevisi et al. an Rattenschwanzarterien zeigten eine ähnlich schwache Aktivierung dieser MAPK durch ET-1 [108]: In diesen Untersuchungen wurden Arteriensegmente mit 50 nM Endothelin-1 für 10 min behandelt und die Phosphorylierung von ERK1/2 war gegenüber der Negativkontrolle 1,8-fach (pERK1) bzw. 2,5-fach (pERK2) erhöht.

Weder die Protease Thrombin noch das aktivierende Peptid SFLLRN erhöhten die Phosphorylierung von ERK1/2 in hCASMCs. Jerius et al. untersuchten die Tyrosin-Phosphorylierung in frisch präparierten Abschnitten bovinen glatten Muskelzellgewebes aus Carotisarterien [87]. Sie stimulierten die Zellen mit einer Thrombin-Konzentration, die das 100-fache der hier verwendeten Konzentration beträgt. Aus einer Bande bei 46 kDa im Western-Blot schließen sie auf die Phosphorylierung einer MAPK mit einem Maximum nach 1 min Stimulation. Diese Methodik zeigt wesentliche Unterschiede zu der hier verwendeten Methodik auf und kann daher nicht zu einem Vergleich der Ergebnisse herangezogen werden.

Ein veränderter TF- oder p67^{phox}-Level in den hCASMCs konnte nach 24 h Stimulation mit keinem der drei Agonisten festgestellt werden. Proinflammatorische Zellfunktionen wie erhöhte TF-Expression oder verstärkte NADPH-Oxidase-Aktivität scheinen durch ET-1, Thrombin und SFLLRN an hCASMCs nicht induziert zu werden.

4.2.2 Proinflammatorische Faktoren IL-1 β , IL-6 und LPS

Die Phosphorylierung von ERK1/2 sowie der Proteinlevel von TF und p67^{phox} in hCASMCs wurden nach Stimulation mit IL-1 β , IL-6 oder LPS untersucht. Auf die Phosphorylierung von ERK1/2 hatte IL-1 β keinen stimulierenden Einfluss. Der TF-Proteinlevel war nach 5 min Stimulation mit diesem Zytokin leicht erhöht und nach 2 h leicht erniedrigt. Nach 24 h schien der p67^{phox}-Level ebenfalls leicht erniedrigt. Diese Ergebnisse sind nicht signifikant und deshalb nicht gesichert. Falls höhere Stichprobenzahlen oder andere Untersuchungen diese Beobachtungen bestätigen, könnte der schnelle und kurzfristige Anstieg von TF-Protein auf eine größere Verfügbarkeit bereits vorhandenen Proteins hinweisen. Vielleicht liegt ein Teil des TF-Proteins in komplexierter/gebundener Form vor und ist im Western-Blot erst nach induzierter Freisetzung aus diesem Komplex nachweisbar. Der Abfall des Proteins nach 2 h ließe sich durch eine Freisetzung ins Medium erklären. Die Phosphorylierung und von p67^{phox} und dessen Transport in die Zellmembran zur Bildung des aktiven NADPH-Komplexes wäre eine Erklärung für den Abfall von p67^{phox}.

Die proinflammatorische Wirkung von IL-1 β , IL-6 und LPS wurde u.a. von Calabró et al. anhand der Induktion von CRP (C-reaktives Protein) nachgewiesen [139]. Nach 48 h

Stimulation von hCASMCs mit diesen Faktoren war CRP im Überstand signifikant erhöht. Humane glatte Gefäßmuskelzellen exprimieren den IL-6-Rezeptor nur geringfügig, aber durch Inkubation der Zellen mit dem IL-6/sIL-6R-Komplex konnten Klouche et al. die Expression von gp130 und auch die Sekretion von IL-6 erhöhen [140]. Kaur et al. wiesen an den gleichen Zellen eine IL-1 β -induzierte Aktivierung der NADPH-Oxidase nach 24 h mit dem Cytochrom-c-Assay nach [141]. Allerdings wurden vorher die Zellen für 24 h in serumfreiem Medium kultiviert und während der 24-stündigen Inkubation mit IL-1 β enthielt das Medium nur 0,1 % Serum. Das normale Kulturmedium für diese Zellen enthält 5 % Serum. Die Versuchsbedingungen entsprechen also nicht denen in der vorliegenden Arbeit.

IL-6 erhöhte die Menge an nachweisbarem TF nach 5 min Stimulation, nach 2 h zeichnete sich hingegen eine Erniedrigung ab. Dies entspricht einem ähnlichen Ablauf wie bei der Stimulation mit IL-1 β und kann auf dieselben Mechanismen beruhen. Nach 6-stündiger Inkubation von hCASMCs mit IL-6 war der pERK1/2-Level erhöht, ebenso nach 24 h. Diese Erhöhungen waren sehr gering, aber gut reproduzierbar. Eine Aktivierung der MAPK nach mehreren Stunden kann auf sekundäre Effekte zurückzuführen sein. Der p67^{phox}-Level blieb nach 24 h unverändert. Dies spricht gegen eine Induktion des NADPH-Oxidase-Signalwegs durch IL-6.

Nach 5 min Stimulation mit LPS war der TF-Level leicht erhöht. Eine Aktivierung von ERK1/2 konnte nicht nachgewiesen werden (siehe 4.1.4/[137]). Der p67^{phox}-Level schwankte zwischen einer leichten Erhöhung nach 5 min, einem Abfall nach 2 h und wiederum einer leichten Erhöhung nach 24 h. Während eine erhöhte Verfügbarkeit des Proteins die schnelle Erhöhung erklären könnte, könnte bei einer Aktivierung des Proteins durch Phosphorylierung und Komplexbildung den Abfall des nachweisbaren p67^{phox}-Levels nach 2 h erklären. Nach 24 h können sich eine induzierte Transkription des Gens und Translation der mRNA für p67^{phox} in einem erhöhten Proteinlevel äußern.

4.2.3 Einfluss von Autoantikörpern auf die Aktivierung von ERK1/2

Humane CASMCs zeigten bei Stimulation sowohl mit PAR-Autoantikörper-positivem IgG als auch mit Kontroll-IgG eine leichte Aktivierung von ERK1/2. Die zwei getesteten ET(A)-Antikörper-Präparate und das Endobulin bewirkten keine Aktivierung dieser MAPK. Die Costimulation mit IL-1 β , IL-6 oder LPS hatte keinen Einfluss. Diese Ergebnisse hinsichtlich der Wirkung der Antikörper-Präparate sind vergleichbar mit den Daten, die mit Kardiomyozyten erhoben wurden (siehe 4.1.5). Die Costimulanzen bewirkten auch in den Vorversuchen an hCASMCs nach 20 min keine Aktivierung von ERK1/2 (siehe 4.2.2).

Auffällig ist jedoch, dass der PAR1/2-Agonist SFLLRN keinen Effekt hatte und ET-1 einen pERK1/2-Anstieg bewirkte. Da SFLLRN zu keinem Zeitpunkt im zuvor getesteten Bereich von 1 min bis 24 h eine ERK1/2-Aktivierung hervorrief, kann von einer PAR1/2-unabhängigen Aktivierung dieses Signalproteins durch das IgG der Patienten ausgegangen werden. Da außerdem das Kontroll-IgG den gleichen Effekt wie das Patienten-IgG zeigte, könnte eine unspezifische Aktivierung von ERK1/2 durch das IgG oder andere Faktoren in den IgG-Präparaten vorliegen. Im Gegensatz zu den hCASMCs allerdings waren bei den Kardiomyozyten die Effekte von IgG mit PAR-Autoantikörpern und Kontroll-IgG unterschiedlich stark. Dort scheint zusätzlich zur unspezifischen Aktivierung ein PAR1/2-abhängiger Mechanismus eine Rolle zu spielen.

4.3 Thrombozytenaggregation und Serotonin-Freisetzung

4.3.1 Methodenetablierung Thrombozyten-Aggregometrie

Die Thrombozyten-Aggregometrie ist eine Methode zur Beurteilung der Funktionalität von Thrombozyten. In der klinischen Diagnostik wird hierfür PRP (*platelet rich plasma*) aus Citrat-antikoaguliertem Blut verwendet. In dieser Arbeit wurden die Thrombozyten für funktionelle Untersuchungen jedoch gewaschen. Individuelle Unterschiede im Plasma der Thrombozytenspender entfallen somit, ebenso jedoch die natürliche Regulation der Thrombozytenaktivität durch pro- und antikoagulatorische Plasmafaktoren. Die Reaktionsfähigkeiten von PRP und gewaschenen Thrombozyten auf die Aktivatoren Collagen und ADP wurden verglichen. Die Aggregation gewaschener Thrombozyten durch Collagen war deutlich niedriger als bei Thrombozyten in PRP. Im Gegensatz zu PRP reagierten gewaschene Thrombozyten nicht auf ADP.

Das Waschen der Thrombozyten erfolgt unter Zugabe von Apyrase und Prostaglandin E₁ (PGE₁). Apyrase baut aus Thrombozyten und Erythrozyten freigesetztes ADP und ATP ab - Nukleotide, die Thrombozyten aktivieren können. PGE₁ ist ein potenter Thrombozyteninhibitor. Diese beiden Zusätze verhindern eine vorzeitige Aktivierung der Thrombozyten während der Zentrifugations- und Resuspendierungsschritte. Da im oben beschriebenen Vergleich von PRP und gewaschenen Thrombozyten diese nicht auf ADP reagierten, wurde die Rolle der Apyrase untersucht. Es wurde festgestellt, dass sowohl mit als auch ohne Apyrase gewaschene Thrombozyten nicht durch Zugabe von ADP aggregierten. Im Vergleich zur Kontrolle (0,9 % NaCl) war die Lichtdurchlässigkeit beider Thrombozytensuspensionen jedoch vermindert, was auf einen induzierten Formenwandel der Thrombozyten schließen lässt. Dieser thrombozytäre Wandel von der diskoiden zur sphärischen Form, auch als *shape change* bezeichnet, ist eine Reaktion auf nur geringe Stimulation und geht einer Aggregation voraus [142]. Mit Collagen zeigten ohne Apyrase gewaschene Thrombozyten eine geringere Aggregation als mit Apyrase, was für den protektiven Effekt der Apyrase bei der Waschprozedur spricht. Aus diesem Versuch lässt sich schließen, dass PGE₁ für die fehlende Thrombozytenaggregation durch ADP verantwortlich sein konnte.

Versuche mit dem aktivierenden Peptid SFLLRN zeigten eine konzentrationsabhängige Aggregation und ähnlich wie bei Collagen (und ADP) eine verminderte Aggregation gewaschener Thrombozyten im Vergleich zu PRP-Präparaten.

4.3.2 Aggregation, Slope und Serotonin-Freisetzung

Der Slope beschreibt den Anstieg der Kurve des Aggregationsverlaufs. Dabei können verminderte Werte <0 entstehen, wenn es zu einem Formenwandel der Thrombozyten kommt und somit die gemessene Lichtdurchlässigkeit der Suspension sinkt. Die Serotonin-Freisetzung ist neben der Aggregation ein weiteres Maß für die Thrombozytenreaktion. Das in den elektronendichten Granula gespeicherte Serotonin wird von aktivierten Thrombozyten

freigesetzt. Es gilt wiederum als schwacher Aktivator von Thrombozyten. Serotonin führt aber auch zur Aktivierung von Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen. Die gefäßverengende Wirkung und Effekte auf das periphere und zentrale Nervensystem von Serotonin werden mit diversen kardiovaskulären Erkrankungen in Zusammenhang gebracht [143]. Frishman et al. stellten dar, dass Ketanserin als hoch selektiver Serotonin-Rezeptor-2-Antagonist (mit zusätzlichem Antagonismus gegen α -adrenerge Rezeptoren) eine ähnlich antihypertensive Wirkung besitzt wie vergleichbare Medikamente [143]. Außerdem kann Ketanserin möglicherweise der Behandlung peripherer Gefäßerkrankungen dienen [143].

In weiteren Versuchen wurden Konzentrationsabhängigkeiten von Thrombin, dem stimulatorischen Peptid SFLLRN und dem partiell-agonistischen Peptid YFLLRN erstellt. Entsprechend den Erwartungen korrelierten die Aggregationskurven mit denen der Serotonin-Freisetzung. Der Slope, also die Aggregationsgeschwindigkeit, war bei mittleren Konzentrationen von Thrombin und dem Peptid SFLLRN sogar größer als bei höheren. Wie von Rasmussen et al. gezeigt induzierte auch in dieser Arbeit das Peptid YFLLRN nur einen Formenwandel der Thrombozyten [123,123,144].

4.3.3 Einfluss von Patienten-IgG auf die Thrombozytenfunktion

Durch die Vorinkubation der Thrombozyten mit IgG von Patienten oder Kontrollpersonen sollte festgestellt werden, ob Autoantikörper gegen PAR und ET(A) die Thrombozytenfunktion beeinflussen. Bei Aggregation und Serotonin-Freisetzung konnte kein genereller Unterschied zwischen Patienten-IgG und Kontroll-IgG festgestellt werden. Es fiel jedoch auf, dass die Thrombozyten durch Vorinkubation mit dem Immunglobulin des Patienten 1 nach Stimulation mit 3 μ M SFLLRN eher höhere Werte für Aggregation und Serotonin-Freisetzung zeigten als durch Vorinkubation mit Kontroll-IgG, während die Werte bei IgG von Patient 5 sowohl mit 3 μ M als auch mit 10 μ M SFLLRN niedriger ausfielen. Die Aktivität der Thrombozyten war mit IgG von Patient 1 erhöht und von Patient 5 erniedrigt. Das IgG der anderen drei Patienten zeigte gar keine oder keine einheitlichen Effekte. Eine Wirkung von PAR- oder ET(A)-Autoantikörper auf die Thrombozytenfunktion konnte mit diesem Ergebnis nicht nachgewiesen werden.

In einem weiteren Experiment wurden Thrombozyten mit 1 μ M SFLLRN vorbehandelt. Dieser Ansatz sollte klären, ob eine Vorstimulation der Thrombozyten durch SFLLRN eine Sensibilisierung gegenüber nachfolgende Stimulanzen hervorrufen kann. Nach Zugabe von IgG von Patienten und Kontrollpersonen wurden Aggregation und Slope der Aggregationskurve sowohl mit 3 μ M SFLLRN als auch mit 0,9 % NaCl überprüft.

Aggregation und Slope mit 0,9 % NaCl waren bei vorstimulierten Thrombozyten unabhängig vom IgG-Präparat in 9 von 12 Fällen erhöht. Mit 3 μ M SFLLRN zeigten vorstimulierte Thrombozyten in 7 der 12 Fälle eine Erniedrigung von Aggregation oder Slope. Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass eine teilweise Aktivierung durch 1 μ M SFLLRN die nachfolgende Reaktion auf Stimulanzen verminderte. Die unvollständige Aktivierung der Thrombozyten war anhand einer erhöhten Spontanaggregation erkennbar, konnte aber die Reaktionsintensität bei erneuter, stärkerer Stimulation verringern.

Wurden die Messwerte vorstimulierter Thrombozyten nach Inkubation mit Kontroll-IgG oder Patienten-IgG verglichen, so zeigten sich mit Patienten-IgG Erhöhungen von Aggregation und

4. Diskussion

Slope in 2 der 3 Vergleichsgruppen. Ein fördernder Einfluss von Patienten-IgG auf die erneute Aktivierung präaktivierter Thrombozyten kann demnach nicht ausgeschlossen werden. Ohne Vorstimulation jedoch schien Patienten-IgG eher einen hemmenden Einfluss auf die Thrombozytenfunktion zu haben.

Es ist anzunehmen, dass sich die Seren von Kontrollpersonen und Patienten in Art und Konzentration vieler Faktoren unterscheiden. Zu diesen Faktoren zählen physiologische wie auch medikamentöse. Herz-Kreislauf-Patienten können zum Beispiel Medikamente einnehmen, die die Thrombozytenfunktion hemmen, den Blutdruck verändern oder den Lipidstoffwechsel positiv beeinflussen. Zwar erfolgte eine ausgiebige Dialyse gegen PBS bei der Herstellung der IgG-Präparate, aber nachhaltige Effekte auf die Thrombozytenfunktion waren nicht auszuschließen. Kenntnisse über solche medikamentöse und physiologische Faktoren in den hier verwendeten IgG-Präparaten sind nötig, um Einflüsse auf die Messergebnisse abzuschätzen.

Dass präaktivierte Thrombozyten in vitro eine erhöhte Aktivität zeigen können bewiesen Furman et al. anhand von Untersuchungen bei Patienten mit stabiler koronarer Herzkrankheit [35]. Barradas et al. legen dar, welche Rolle Thrombozytenstruktur und -funktion in der Pathogenese auch peripherer Gefäßkrankheiten spielen [145]. Das Raynaud-Syndrom kann ebenfalls zu den peripheren Gefäßkrankheiten gezählt werden und so könnten Thrombozyten-aktivierende Effekte der PAR- oder ET(A)-Autoantikörper einen Zusammenhang zu diesem Syndrom herstellen. Allgemein kommt es bei endothelialer Dysfunktion zu einer erhöhten Thrombozyten-Gefäßwand-Interaktion, wobei Serotonin und Thromboxan aus Thrombozyten u.a. Gefäßmuskelnzellen aktivieren und damit eine Vasokonstriktion bewirken [146].

4.4 Funktion von Monozyten

4.4.1 Methodenetablierung zur Messung des Superoxidanions

Monozyten wurden aus humanem Blut mit dem *Monocyte Negative Isolation Kit* (Dyna[®] Biotech ASA) isoliert (siehe 2.2.6). Dabei binden Zellmarker-spezifische Antikörper an T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen, Erythrozyten und Granulozyten, nicht aber an Monozyten (Produktbeschreibung). Andere kommerziell erhältliche Monozyten-Isolierungskits funktionieren mit Monozytenmarker-spezifischen Antikörpern, über welche diese Zellen aus der Zellsuspension separiert werden. Monozytenmarker sind oft Rezeptoren für Liganden, die wichtige Zellfunktionen steuern, zum Beispiel CD14, CD11b oder CD16. Der Vorteil der hier verwendeten negativen Selektionsmethode liegt darin, dass die Monozyten frei sind von spezifisch gebundenen Antikörpern. Dadurch wird die Monozytenfunktion nicht durch bereits gebundene Antikörper beeinflusst.

72,3 % der Zellen in der Monozytenpräparation nach dem oben beschriebenen Verfahren waren HLA-DR- und CD14-positiv, also positiv für charakteristische Monozytenmarker. Die restlichen Zellen repräsentierten hauptsächlich Thrombozyten, Erythrozyten und tote Zellen.

In dieser Arbeit wurde eine Methode zur Messung der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies von Monozyten in einer 96-Well-Mikrotiterplatte etabliert. Zunächst wurden die Lumineszenzfarbstoffe Lucigenin und MCLA, ein Luciferinderivat, verglichen. Lucigenin produziert selbst das Superoxidation [147,148,149]. Bei einer Lucigenin-Konzentration von 5 μM ist dieser Umstand vernachlässigbar für eine korrekte Messung des von den Zellen produzierten Superoxidations [150]. Es stellte sich heraus, dass Lucigenin bei Konzentrationen von 5 μM und 25 μM keine Messung der Radikale erlaubte. Im Gegensatz hierzu produzierte MCLA einen signifikanten Anstieg der Lumineszenz durch das Superoxidation. Die Messung von Lumineszenz in einem Mikrotiterplatten-Reader ist weniger sensitiv als in einem Küvettenmessgerät. Für die Mikrotiterplatte reicht die Lumineszenzintensität von den getesteten Lucigenin-Konzentrationen deshalb nicht aus. Ein Vorteil der 96-Well-Platte gegenüber der Messung in Küvetten ist das benötigte geringe Probenvolumen. So lassen sich sowohl Zellen als auch Reagenzien einsparen.

Des Weiteren wurden MCLA-Konzentration und Monozytenzahl optimiert. Entscheidend waren hierbei eine möglichst hohe Sensitivität bei geringem Verbrauch von Zellen sowie die Einhaltung eines optimalen Zeitfensters für den Prozess der Messung. Der Signal-Peak sollte nicht zu früh erscheinen um eine bequeme Handhabung von der Plattenbestückung bis zum Start der Messung zu ermöglichen. Die Zeitspanne bis zum Abfall des Signals auf das Nullniveau sollte nicht zu lang sein, um die benötigte Messzeit zu verkürzen. In dieser Arbeit wurden deshalb 300.000 Monozyten pro Well und eine MCLA-Konzentration von 5 μM als optimale Bedingungen ermittelt.

4.4.2 Vorinkubation mit Antikörper-Präparaten zur Superoxidation-Messung

Nach einstündiger Vorinkubation der Monozyten mit einem IgG-Präparat wurde eine stärkere Bildung der Sauerstoff-Radikale ermittelt als ohne diese zeitliche Verzögerung. Dieser Effekt war PMA-Konzentration-unabhängig. Auch ohne PMA-Stimulation wurden nach 1 h Vorinkubation mehr Superoxidradikale gemessen als ohne Vorinkubation. Abgesehen von rein physiko-chemischen Prozessen von Mediumbestandteilen können die Monozyten selbst für die vermehrte Produktion der Radikale verantwortlich sein. Dies würde auf eine PMA-unabhängige Aktivierung der monozytären NADPH-Oxidase deuten oder auf Stoffwechselvorgänge, die während der Vorinkubation oxidativen Stress hervorrufen.

Dennoch sprechen einige Gründe für eine Vorinkubation mit den IgG-Präparaten zur Beurteilung des Einflusses von Autoantikörpern auf die Monozytenfunktion:

- Im Blut der Patienten vorkommende Autoantikörper können permanent Einfluss nehmen auf die Monozytenfunktion. Nicht ein Soforteffekt ist Gegenstand dieser Untersuchungen, sondern die Möglichkeit eines dauerhaften Einflusses auf die Monozytenfunktion.
- Die Prozedur der Monozytenisolierung kann die Funktionalität der Zellen beeinflussen. Während einer Ruhephase können sich die Zellen regenerieren. Deshalb wurden sie zwischen Isolierung und Zugabe des Antikörper-Präparats 30 min lang im Brutschrank inkubiert.

4. Diskussion

- Ist diese Ruhephase zu lang, können im artifiziellen Milieu wiederum Funktionsverluste oder Differenzierungen der Monozyten eintreten. Mit der einstündigen Inkubation der Antikörper-Präparate wurde deshalb 30 min nach der Monozytenisolierung begonnen.

4.4.3 Einfluss von Autoantikörpern auf die Produktion von Sauerstoff-Radikalen

Vor der Initiation der Produktion von Sauerstoff-Radikalen mit 8 nM, 80 nM oder 800 nM PMA wurden die Monozyten eine Stunde lang mit verschiedenen IgG-Präparaten vorinkubiert. Die Messung von Superoxidanion zeigte keinen Unterschied zwischen der Vorinkubation mit Patienten-IgG oder Kontroll-IgG.

Dörffel et al. konnten eine Präaktivierung von Monozyten von Bluthochdruck-Patienten anhand einer verstärkten Sekretion proinflammatorischer Zytokine nachweisen [151]. Außerdem stellten sie eine erhöhte PMA (800 nM)-induzierte Freisetzung reaktiver Sauerstoff-Spezies aus solchen Monozyten fest [152]. Eine Präaktivierung von Monozyten durch PAR- oder ET(A)-Autoantikörper konnte in dieser Arbeit anhand der PMA-stimulierten Superoxidanion-Bildung nicht festgestellt werden.

4.4.4 Aktivierung von ERK1/2 und Regulation von Tissue-Factor-Protein durch Endothelin-1 und Thrombin

Monozyten exprimieren die Thrombin-Rezeptoren PAR1 und PAR3 sowie die Endothelin-Rezeptoren ET(A) und ET(B) [153,154]. Eine Phosphorylierung der MAPK ERK1/2 innerhalb weniger Minuten weist auf eine direkte Aktivierung dieses Signalweges hin, wohingegen ein Anstieg der Phosphorylierung nach Stunden für sekundäre Effekte der Aktivierung spricht. Die Veränderung des intrazellulären TF-Proteinlevels stellt keinen akuten Effekt dar, denn für eine TF-Erhöhung müssen zunächst die Transkription des TF-Gens und die Translation der mRNA erhöht werden.

Eine Stimulation von Monozyten mit Thrombin oder Endothelin-1 für 2 h bewirkte keine reproduzierbaren Quantifizierungen von TF und pERK1/2 im Western Blot. Die Funktion der frisch isolierten Monozyten von drei unterschiedlichen Blutspendern scheint zu variabel, um eine Aussage zur Aktivierung von TF und pERK1/2 treffen zu können.

In der Literatur lassen sich Hinweise zur proinflammatorischen Wirkung von ET-1 an Monozyten finden. Diese sind über den ET(A)-Rezeptor vermittelt [154]. Über den ET(B)-Rezeptor werden antiinflammatorische Effekte realisiert [153]. Browatzki et al. beschrieben die ET(A)-abhängige Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB und die Expression des proinflammatorischen Moleküls CD40 [154]. Nach King et al. wird über ET(B) die monozytäre Produktion von NO stimuliert und die Adhäsion an die Gefäßwand vermindert [153].

4.4.5 Aktivierung von ERK1/2 und Regulation von Tissue-Factor-Protein durch Autoantikörper

Um die Aussagekraft der Ergebnisse bei Stimulation mit IgG-Präparaten zu beurteilen, wurde in vier unabhängigen Versuchen dasselbe IgG-Präparat eingesetzt und in Hinblick auf TF-Expression und ERK1/2-Phosphorylierung beurteilt. Dabei wurden jeweils Monozyten eines anderen Spenders benutzt. Die Schwierigkeit, reproduzierbare Testergebnisse mit unterschiedlichen, frisch isolierten Monozyten-Präparaten zu erzielen, wurde auch hier deutlich. Demnach können in dieser Arbeit nur eingeschränkt Aussagen zum Einfluss der Autoantikörper auf die Monozytenfunktion getroffen werden.

Bei der Bestimmung des TF-Proteins erbrachte die Vorinkubation mit Kontroll-IgG durchschnittlich höhere Messwerte als mit Patienten-IgG. Die relative Quantifizierung von pERK1/2 zeigte starke Aktivierungen dieser MAPK bei zwei (PAR-Autoantikörper bzw. PAR- und ET(A)-Autoantikörper) von fünf Patienten-IgGs. Ein Unterschied zwischen der Anwesenheit von PAR-Autoantikörpern allein und der Kombination PAR- und ET(A)-Autoantikörper wurde nicht festgestellt. Diese Daten zeigen eine unspezifische, von den PAR- und ET(A)-Rezeptoren unabhängige Stimulierung durch Immunglobulin.

Um die Wirkung der Autoantikörper auf Monozyten wie auch auf Thrombozyten zu untersuchen sollten interindividuelle Unterschiede aufgrund verschiedener Zellpräparate möglichst vermieden werden. Für solche Untersuchungen ist es nötig, größere Mengen an Thrombozyten oder Monozyten der Spender zu erhalten.

Bei der Affinitätschromatografie mit biotinylierten Peptiden werden die Autoantikörper zunächst an die stationäre Phase gebunden. Der Durchfluss sollte dann frei von aktivierenden Autoantikörpern sein. Durch die Elution wird der aufgereinigte Autoantikörper aufgefangen. Dies konnte in den Untersuchungen der Pulsationsrate von Kardiomyozyten bestätigt werden. Dabei zeigten die Durchfluss-Präparate im Gegensatz zu den Autoantikörper-angereicherten Eluaten keine funktionellen Effekte.

Zwei affinitätschromatografisch aufgereinigte PAR-Autoantikörper ließen nach 2 h keine Aktivierung von ERK1/2 erkennen, gleichzeitig jedoch induzierte eines der beiden Präparate eine 3-fach erhöhte Expression des TF-Proteins. Das Durchfluss-Präparat mit ET(A)-Autoantikörpern erhöhte sowohl TF als auch pERK1/2. Das Durchfluss-Präparat ohne Autoantikörper zeigte einen ähnlichen Effekt, allerdings eine nicht ganz so starke Aktivierung der MAPK. Weil dieser Versuch mit einem Monozyten-Präparat durchgeführt wurde, sind die Ergebnisse untereinander vergleichbar.

Es wurde gezeigt, dass auch der Durchfluss aus der Affinitätschromatografie entgegen der Vermutung Monozytenfunktionen aktivierte. Diese Ergebnisse bestätigen die oben formulierte Annahme, dass unspezifische Reaktionen der Immunglobuline sowohl die Phosphorylierung von ERK1/2 als auch die Expression des TF beeinflussen können.

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden funktionelle Autoantikörper gegen die Thrombin-Rezeptoren PAR1 und PAR2 und gegen den Endothelin-Rezeptor ET(A) in Seren von Patienten mit Raynaud-Syndrom und Herz-Kreislauf-Erkrankungen nachgewiesen. Am Modell der spontan pulsierenden Ratten-Kardiomyozyten wurden diese Autoantikörper näher charakterisiert. Die positiv chronotropen Effekte der PAR1/2-Autoantikörper wurden durch das inhibitorische Peptid YFLLRN blockiert. Die Spezifität der negativ chronotropen ET(A)-Rezeptor-Autoantikörper wurde durch die antagonistische Wirkung des spezifischen Blockers BQ610 gezeigt.

Die Wirkung von Patienten-IgG-Präparaten mit den oben genannten Autoantikörpern auf weitere Funktionen von Ventrikel-Kardiomyozyten neonataler Ratten; von humanen, glatten Muskelzellen aus Coronararterien (hCASM); von frisch isolierten, humanen Thrombozyten sowie von Monozyten wurden untersucht. Zum Vergleich wurden die PAR-Agonisten Thrombin und das synthetische, aktivierende Peptid SFLLRN sowie Endothelin-1 verwendet.

Kardiomyozyten reagierten auf Thrombin und das PAR1/2-stimulatorische Peptid SFLLRN positiv und auf Endothelin-1 negativ chronotrop. Endothelin-1 aktivierte die MAPK ERK1/2 in Kardiomyozyten im serumhaltigen System nur leicht, Thrombin dagegen nicht. Eine SFLLRN-Stimulation bewirkte eine transiente Aktivierung. Eine leicht erhöhte Menge der NADPH-Oxidase-Untereinheit p67^{phox} konnte nach 24 h ebenso nur mit dem Peptid SFLLRN erzielt werden. Diese Effekte auf ERK1/2 und p67^{phox} wurden wahrscheinlich über den Rezeptor PAR2 vermittelt.

Während das therapeutische Immunglobulin-Präparat Endobulin und aufgereinigte ET(A)-Autoantikörper ERK1/2 nicht aktivierten, bewirkten IgG-Präparate mit PAR-Autoantikörpern und der PAR2-Autoantikörper aus Kaninchen eine ähnliche Aktivierung wie SFLLRN. Das Kontroll-IgG induzierte eine starke Aktivierung von ERK1/2. Die Coinkubation mit IL-1 β , nicht aber mit IL-6 oder LPS, erhöhte die Phosphorylierung von ERK1/2 in allen Fällen. IL-1 β und LPS aktivierten auch allein diese MAPK.

In hCASCs erhöhte Endothelin-1 den Phosphorylierungslevel von ERK1/2 nach 20 min, Thrombin und SFLLRN zeigten keinen Effekt auf diese Signalproteine. Die Proteinlevel von TF und p67^{phox} wurden von keinem der drei Stimulanzen verändert. IgG-Präparate mit PAR-Autoantikörper und Kontroll-IgGs bewirkten hingegen eine Aktivierung von ERK1/2. ET(A)-Autoantikörper ebenso wie das therapeutische Immunglobulin-Präparat Endobulin aktivierten diese MAPK nicht. Die Zytokine IL-1 β und IL-6 sowie LPS hatten auf diese Wirkung der Antikörper keinen Einfluss.

Für die Beurteilung der Thrombozytenfunktion wurde zunächst die Aggregometrie im Labor etabliert. Die Reaktionen von PRP und gewaschene Thrombozyten wurden verglichen. Gewaschene Thrombozyten aggregieren weniger stark als PRP auf Collagen und SFLLRN, mit ADP aggregieren sie nicht. Die Serotonin-Freisetzung konnte ebenso als Maß für die Thrombozytenaktivität herangezogen werden. Die Ergebnisse der Thrombozytenaktivierung durch Patienten-IgG waren unterschiedlich. Versuche mit vorstimulierten Thrombozyten

zeigten, dass ein fördernder Einfluss von Patienten-IgG auf die Aktivierung präaktivierter Thrombozyten nicht ausgeschlossen werden kann. Ohne Vorstimulation jedoch schien Patienten-IgG eher einen hemmenden Einfluss auf die Thrombozytenfunktion zu haben.

Weiterhin wurde eine Methode zur Messung von Superoxidanion freigesetzt aus Monozyten etabliert. Eine Vorinkubation von Monozyten mit Patienten-IgG hatte keinen Einfluss auf die Produktion von Superoxidanion im Vergleich zu Kontroll-IgG. Die Beurteilung der Bestimmung von TF-Protein und pERK1/2 erwies sich durch die Verwendung unterschiedlicher Monozyten-Präparate als problematisch. Ähnlich wie bei Versuchen mit frisch isolierten Thrombozyten konnte nur bei zwei von fünf Patienten-IgGs eine stimulierende Wirkung anhand der ERK1/2-Phosphorylierung gefunden werden.

Aus den erhobenen Befunden kann geschlussfolgert werden, dass unter den gewählten Bedingungen PAR1/2- und ET(A)-Autoantikörper keine allgemeine Wirkung auf die in dieser Arbeit untersuchten Funktionen von glatten Gefäßmuskelzellen, Thrombozyten, Monozyten oder Kardiomyozyten zeigten. Der Nachweis der agonistischen Autoantikörper in den IgG-Präparaten der Patienten war jedoch über die Bestimmung der Pulsationsrate von Kardiomyozyten möglich.

Literaturverzeichnis

- [1] Cervera, R. und Shoenfeld, Y. (2007): Pathogenic mechanisms and clinical relevance of autoantibodies, Shoenfeld, Y.; Gershwin, M. E. und Meroni, P. L., *Autoantibodies*, 2. Auflage, Seite 29-35, Elsevier Academic Press, London, ISBN: 978-0-444-52763-9.
- [2] Oertelt, S.; Invernizzi, P.; Podda, M. und Gershwin, M. E. (2007): What is an autoantibody?, Shoenfeld, Y.; Gershwin, M. E. und Meroni, P. L., *Autoantibodies*, 2. Auflage, Seite 3-6, Elsevier Academic Press, London, ISBN: 978-0-444-52763-9.
- [3] Amital, H. und Shoenfeld, Y. (2007): Natural autoantibodies, heralding, protecting and inducing autoimmunity, Shoenfeld, Y.; Gershwin, M. E. und Meroni, P. L., *Autoantibodies*, 2. Auflage, Seite 7-12, Elsevier Academic Press, London, ISBN: 978-0-444-52763-9.
- [4] Avrameas, S. und Ternynck, T. (1993): The natural autoantibodies system: between hypotheses and facts, *Mol.Immunol.* 30 [12], Seite 1133-1142. URL: PM:8366863
- [5] Kohler, H.; Bayry, J.; Nicoletti, A. und Kaveri, S. V. (2003): Natural autoantibodies as tools to predict the outcome of immune response?, *Scand.J.Immunol.* 58 [3], Seite 285-289. URL: PM:12950673
- [6] Cohen, I. R. (2000): Discrimination and dialogue in the immune system, *Semin.Immunol.* 12 [3], Seite 215-219. URL: PM:10910742
- [7] Gorsuch, A. N.; Spencer, K. M.; Lister, J.; McNally, J. M.; Dean, B. M.; Bottazzo, G. F. und Cudworth, A. G. (1981): Evidence for a long prediabetic period in type I (insulin-dependent) diabetes mellitus, *Lancet* 2 [8260-61], Seite 1363-1365. URL: PM:6118756
- [8] Harel, M. und Shoenfeld, Y. (2006): Predicting and preventing autoimmunity, myth or reality?, *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1069, Seite 322-345. URL: PM:16855160
- [9] Arbuckle, M. R.; McClain, M. T.; Rubertone, M. V.; Scofield, R. H.; Dennis, G. J.; James, J. A. und Harley, J. B. (2003): Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus, *N.Engl.J.Med.* 349 [16], Seite 1526-1533. URL: PM:14561795
- [10] Dechend, R.; Gratze, P.; Wallukat, G.; Shagdarsuren, E.; Plehm, R.; Bräsen, J. H.; Fiebeler, A.; Schneider, W.; Caluwaerts, S.; Vercruysse, L.; Pijnenborg, R.; Luft, F. C. und Müller, D. N. (2005): Agonistic autoantibodies to the AT1 receptor in a transgenic rat model of preeclampsia, *Hypertension* 45 [4], Seite 742-746. URL: PM:15699466
- [11] Dechend, R.; Homuth, V.; Wallukat, G.; Kreuzer, J.; Park, J. K.; Theuer, J.; Juepner, A.; Gulba, D. C.; Mackman, N.; Haller, H. und Luft, F. C. (2000): AT(1) receptor agonistic antibodies from preeclamptic patients cause vascular cells to express tissue factor, *Circulation* 101 [20], Seite 2382-2387. URL: PM:10821814

- [12] Wallukat, G.; Morwinski, M.; Kowal, K.; Förster, A.; Boewer, V. und Wollenberger, A. (1991): Autoantibodies against the beta-adrenergic receptor in human myocarditis and dilated cardiomyopathy: beta-adrenergic agonism without desensitization, *Eur.Heart J.* 12 Suppl D, Seite 178-181. URL: PM:1717272
- [13] Wallukat, G. und Wollenberger, A. (1991): Autoantibodies to beta 2-adrenergic receptors with antiadrenergic activity from patients with allergic asthma, *J.Allergy Clin.Immunol.* 88 [4], Seite 581-587. URL: PM:1655856
- [14] Fu, M. L.; Herlitz, H.; Wallukat, G.; Hilme, E.; Hedner, T.; Hoebeke, J. und Hjalmarson, A. (1994): Functional autoimmune epitope on alpha 1-adrenergic receptors in patients with malignant hypertension, *Lancet* 344 [8938], Seite 1660-1663. URL: PM:7527885
- [15] Dörffel, W. V.; Felix, S. B.; Wallukat, G.; Brehme, S.; Bestvater, K.; Hofmann, T.; Kleber, F. X.; Baumann, G. und Reinke, P. (1997): Short-term hemodynamic effects of immunoadsorption in dilated cardiomyopathy, *Circulation* 95 [8], Seite 1994-1997. URL: PM:9133505
- [16] Felix, S. B.; Staudt, A.; Dörffel, W. V.; Stangl, V.; Merkel, K.; Pohl, M.; Docke, W. D.; Morgera, S.; Neumayer, H. H.; Wernecke, K. D.; Wallukat, G.; Stangl, K. und Baumann, G. (2000): Hemodynamic effects of immunoadsorption and subsequent immunoglobulin substitution in dilated cardiomyopathy: three-month results from a randomized study, *J.Am.Coll.Cardiol.* 35 [6], Seite 1590-1598. URL: PM:10807465
- [17] Müller, J.; Wallukat, G.; Dandel, M.; Bieda, H.; Brandes, K.; Spiegelsberger, S.; Nissen, E.; Kunze, R. und Hetzer, R. (2000): Immunoglobulin adsorption in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy, *Circulation* 101 [4], Seite 385-391. URL: PM:10653829
- [18] Dragun, D.; Müller, D. N.; Bräsen, J. H.; Fritsche, L.; Nieminen-Kelhä, M.; Dechend, R.; Kintscher, U.; Rudolph, B.; Hoebeke, J.; Eckert, D.; Mazak, I.; Plehm, R.; Schönemann, C.; Unger, T.; Budde, K.; Neumayer, H. H.; Luft, F. C. und Wallukat, G. (2005): Angiotensin II type 1-receptor activating antibodies in renal-allograft rejection, *N.Engl.J.Med.* 352 [6], Seite 558-569.
- [19] Wallukat, G.; Nissen, E.; Müller, J.; Brinckmann, R.; Schimke, I. und Kunze, R. (2002): The pathophysiological role of autoantibodies directed to G-protein coupled receptors and therapeutic strategies of antibody removal, Conrad, K.; Fritzler, M.; Meurer, M.; Sack, U. und Shoenfeld, Y., *From proteomics to molecular epidemiology: Relevance of autoantibodies. Report on the 6th Symposium on Autoantibodies*, Seite 332-372, Dresden.
- [20] Luther, H. P.; Homuth, V. und Wallukat, G. (1997): Alpha 1-adrenergic receptor antibodies in patients with primary hypertension, *Hypertension* 29 [2], Seite 678-682. URL: PM:9040456
- [21] Wallukat, G.; Nissen, E.; Morwinski, R. und Müller, J. (2000): Autoantibodies against the beta- and muscarinic receptors in cardiomyopathy, *Herz.* 25 [3], Seite 261-266.
- [22] Elies, R.; Ferrari, I.; Wallukat, G.; Lebesgue, D.; Chiale, P.; Elizari, M.; Rosenbaum, M.; Hoebeke, J. und Levin, M. J. (1996): Structural and functional

- analysis of the B cell epitopes recognized by anti-receptor autoantibodies in patients with Chagas' disease, *J.Immunol.* 157 [9], Seite 4203-4211. URL: PM:8892658
- [23] Sterin-Borda, L.; Perez, Leiros C.; Wald, M.; Cremaschi, G. und Borda, E. (1988): Antibodies to beta 1 and beta 2 adrenoreceptors in Chagas' disease, *Clin.Exp.Immunol.* 74 [3], Seite 349-354.
- [24] Wallukat, G. und Wollenberger, A. (1987): Effects of the serum gamma globulin fraction of patients with allergic asthma and dilated cardiomyopathy on chronotropic beta adrenoceptor function in cultured neonatal rat heart myocytes, *Biomed.Biochim.Acta.* 46 [8-9], Seite S634-S639.
- [25] Wallukat, G.; Homuth, V.; Fischer, T.; Lindschau, C.; Horstkamp, B.; Jupner, A.; Baur, E.; Nissen, E.; Vetter, K.; Neichel, D.; Dudenhausen, J. W.; Haller, H. und Luft, F. C. (1999): Patients with preeclampsia develop agonistic autoantibodies against the angiotensin AT1 receptor, *J.Clin.Invest.* 103 [7], Seite 945-952.
- [26] Fu, M. L.; Herlitz, H.; Schulze, W.; Wallukat, G.; Micke, P.; Eftekhari, P.; Sjogren, K. G.; Hjalmarson, A.; Muller-Esterl, W. und Hoebeke, J. (2000): Autoantibodies against the angiotensin receptor (AT1) in patients with hypertension, *J.Hypertens.* 18 [7], Seite 945-953. URL: PM:10930193
- [27] Dragun, D.; Wallukat, G.; Dechend, R.; Bräsen, J. H.; Müller, D. N.; Neumayer, H. H.; Budde, K. und Luft, F. C. (2002): Agonistic antibodies targeting angiotensin II type 1 receptor cause acute vascular rejection in the absence of immunological risk, Conrad, K.; Fritzler, M.; Meurer, M.; Sack, U. und Shoenfeld, Y., From proteomics to molecular epidemiology: Relevance of autoantibodies. Report on the 6th Symposium on Autoantibodies , Seite 381-382, Dresden.
- [28] Fu, L. X.; Magnusson, Y.; Bergh, C. H.; Liljeqvist, J. A.; Waagstein, F.; Hjalmarson, A. und Hoebeke, J. (1993): Localization of a functional autoimmune epitope on the muscarinic acetylcholine receptor-2 in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy, *J.Clin.Invest* 91 [5], Seite 1964-1968. URL: PM:7683693
- [29] Eftekhari, P.; Salle, L.; Lezoualc'h, F.; Mialet, J.; Gastineau, M.; Briand, J. P.; Isenberg, D. A.; Fournie, G. J.; Argibay, J.; Fischmeister, R.; Muller, S. und Hoebeke, J. (2000): Anti-SSA/Ro52 autoantibodies blocking the cardiac 5-HT4 serotonergic receptor could explain neonatal lupus congenital heart block, *Eur.J.Immunol.* 30 [10], Seite 2782-2790. URL: PM:11069058
- [30] Lewis, R. A.; Selwa, J. F. und Lisak, R. P. (1995): Myasthenia gravis: immunological mechanisms and immunotherapy, *Ann.Neurol.* 37 Suppl 1:S51-62., Seite S51-S62.
- [31] Costagliola, S.; Morgenthaler, N. G.; Hoermann, R.; Badenhop, K.; Struck, J.; Freitag, D.; Poertl, S.; Weglohner, W.; Hollidt, J. M.; Quadbeck, B.; Dumont, J. E.; Schumm-Draeger, P. M.; Bergmann, A.; Mann, K.; Vassart, G. und Usadel, K. H. (1999): Second generation assay for thyrotropin receptor antibodies has superior diagnostic sensitivity for Graves' disease, *J.Clin.Endocrinol.Metab* 84 [1], Seite 90-97. URL: PM:9920067
- [32] (1990): Pschyrembel Klinisches Wörterbuch, 256., neu bearb. Auflage. Auflage , Walter de Gruyter & Co., Berlin, ISBN: 3-11-010881-X.

- [33] Caspary, L. und Creutzig, A. (2006): [Raynaud's phenomenon--current diagnosis and therapy], *Dtsch.Med.Wochenschr.* 131 [21], Seite 1223-1227. URL: PM:16721713
- [34] Doutre, M. (1999): Physiopathology of urticaria, *Eur.J.Dermatol.* 9 [8], Seite 601-605.
- [35] Furman, M. I.; Benoit, S. E.; Barnard, M. R.; Valeri, C. R.; Borbone, M. L.; Becker, R. C.; Hechtman, H. B. und Michelson, A. D. (1998): Increased platelet reactivity and circulating monocyte-platelet aggregates in patients with stable coronary artery disease, *J.Am.Coll.Cardiol.* 31 [2], Seite 352-358.
- [36] Golino, P.; Crea, F. und Willerson, J. T. (2002): How to study the effects of platelet aggregation and thrombosis on coronary vasomotion and their clinical relevance, *Ital.Heart J.* 3 [4], Seite 220-225.
- [37] Machado, A. P.; Saavedra, J. A. und Ribeiro, C. (1994): Insights into the role of thromboxane A2 and serotonin in the pathogenesis of unstable angina, *Rev.Port.Cardiol.* 13 [12], Seite 935-46, 893.
- [38] Herve, P.; Humbert, M.; Sitbon, O.; Parent, F.; Nunes, H.; Legal, C.; Garcia, G. und Simonneau, G. (2001): Pathobiology of pulmonary hypertension. The role of platelets and thrombosis, *Clin.Chest Med.* 22 [3], Seite 451-458.
- [39] Mosler, N (14-3-2007): Pulmonale Hypertonie - Neuer Wirkstoff für PAH-Therapie, *Cardio News*, Seite 16-16.
- [40] Erdmann, E (14-3-2007): PAH-Patienten hilft, was Rauchen die Männlichkeit zurückgeben kann, *Cardio News*, Seite 14-14.
- [41] Hoeper, M. (14-3-2007): Neue pharmakologische Therapien: Lässt sich die Transplantation bei Lungenhochdruck verhindern?, *Cardio News*, Seite 14-15.
- [42] Altieri, D. C. und Edgington, T. S. (1990): Identification of effector cell protease receptor-1. A leukocyte-distributed receptor for the serine protease factor Xa, *J.Immunol.* 145 [1], Seite 246-253. URL: PM:2162887
- [43] Behrendt, N.; Ronne, E. und Dano, K. (1995): The structure and function of the urokinase receptor, a membrane protein governing plasminogen activation on the cell surface, *Biol.Chem.Hoppe Seyler* 376 [5], Seite 269-279. URL: PM:7662169
- [44] Dery, O.; Corvera, C. U.; Steinhoff, M. und Bunnett, N. W. (1998): Proteinase-activated receptors: novel mechanisms of signaling by serine proteases, *Am.J.Physiol* 274 [6 Pt 1], Seite C1429-C1452. URL: PM:9696685
- [45] Vu, T. K.; Hung, D. T.; Wheaton, V. I. und Coughlin, S. R. (1991): Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation, *Cell* 64 [6], Seite 1057-1068. URL: PM:1672265
- [46] Colognato, R.; Slupsky, J. R.; Jendrach, M.; Burysek, L.; Syrovets, T. und Simmet, T. (2003): Differential expression and regulation of protease-activated receptors in human peripheral monocytes and monocyte-derived antigen-presenting cells, *Blood* 102 [7], Seite 2645-2652. URL: PM:12805069
- [47] Li, T. und He, S. (2006): Induction of IL-6 release from human T cells by PAR-1 and PAR-2 agonists, *Immunol.Cell Biol.* 84 [5], Seite 461-466. URL: PM:16869943

- [48] Nystedt, S.; Emilsson, K.; Wahlestedt, C. und Sundelin, J. (1994): Molecular cloning of a potential proteinase activated receptor, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 91 [20], Seite 9208-9212. URL: PM:7937743
- [49] Belham, C. M.; Tate, R. J.; Scott, P. H.; Pemberton, A. D.; Miller, H. R.; Wadsworth, R. M.; Gould, G. W. und Plevin, R. (1996): Trypsin stimulates proteinase-activated receptor-2-dependent and -independent activation of mitogen-activated protein kinases, *Biochem.J.* 320 (Pt 3), Seite 939-946. URL: PM:9003384
- [50] Camerer, E.; Rottingen, J. A.; Iversen, J. G. und Prydz, H. (1996): Coagulation factors VII and X induce Ca²⁺ oscillations in Madin-Darby canine kidney cells only when proteolytically active, *J.Biol.Chem.* 271 [46], Seite 29034-29042. URL: PM:8910556
- [51] Mirza, H.; Schmidt, V. A.; Derian, C. K.; Jesty, J. und Bahou, W. F. (1997): Mitogenic responses mediated through the proteinase-activated receptor-2 are induced by expressed forms of mast cell a, *Blood* 90 [10], Seite 3914-3922. URL: PM:9354658
- [52] Molino, M.; Barnathan, E. S.; Numerof, R.; Clark, J.; Dreyer, M.; Cumashi, A.; Hoxie, J. A.; Schechter, N.; Woolkalis, M. und Brass, L. F. (1997): Interactions of mast cell tryptase with thrombin receptors and PAR-2, *J.Biol.Chem.* 272 [7], Seite 4043-4049. URL: PM:9020112
- [53] Bretschneider, E.; Kaufmann, R.; Braun, M.; Wittpoth, M.; Glusa, E.; Nowak, G. und Schror, K. (1999): Evidence for proteinase-activated receptor-2 (PAR-2)-mediated mitogenesis in coronary artery smooth muscle cells, *Br.J.Pharmacol.* 126 [8], Seite 1735-1740. URL: PM:10372815
- [54] Camerer, E.; Huang, W. und Coughlin, S. R. (2000): Tissue factor- and factor X-dependent activation of protease-activated receptor 2 by factor VIIa, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 97 [10], Seite 5255-5260.
- [55] Ishihara, H.; Connolly, A. J.; Zeng, D.; Kahn, M. L.; Zheng, Y. W.; Timmons, C.; Tram, T. und Coughlin, S. R. (1997): Protease-activated receptor 3 is a second thrombin receptor in humans, *Nature* 386 [6624], Seite 502-506. URL: PM:9087410
- [56] Xu, W. F.; Andersen, H.; Whitmore, T. E.; Presnell, S. R.; Yee, D. P.; Ching, A.; Gilbert, T.; Davie, E. W. und Foster, D. C. (1998): Cloning and characterization of human protease-activated receptor 4, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95 [12], Seite 6642-6646. URL: PM:9618465
- [57] Kahn, M. L.; Zheng, Y. W.; Huang, W.; Bigornia, V.; Zeng, D.; Moff, S.; Farese, R. V., Jr.; Tam, C. und Coughlin, S. R. (1998): A dual thrombin receptor system for platelet activation, *Nature* 394 [6694], Seite 690-694. URL: PM:9716134
- [58] Selak, M. A.; Chignard, M. und Smith, J. B. (1988): Cathepsin G is a strong platelet agonist released by neutrophils, *Biochem.J.* 251 [1], Seite 293-299. URL: PM:3390156
- [59] Sambrano, G. R.; Huang, W.; Faruqi, T.; Mahrus, S.; Craik, C. und Coughlin, S. R. (2000): Cathepsin G activates protease-activated receptor-4 in human platelets, *J.Biol.Chem.* 275 [10], Seite 6819-6823. URL: PM:10702240

- [60] Blackhart, B. D.; Emilsson, K.; Nguyen, D.; Teng, W.; Martelli, A. J.; Nystedt, S.; Sundelin, J. und Scarborough, R. M. (1996): Ligand cross-reactivity within the protease-activated receptor family, *J.Biol.Chem.* 271 [28], Seite 16466-16471. URL: PM:8663335
- [61] Steinberg, S. F. (2005): The cardiovascular actions of protease-activated receptors, *Mol.Pharmacol.* 67 [1], Seite 2-11. URL: PM:15371558
- [62] Ludeman, M. J.; Zheng, Y. W.; Ishii, K. und Coughlin, S. R. (2004): Regulated shedding of PAR1 N-terminal exodomain from endothelial cells, *J.Biol.Chem.* 279 [18], Seite 18592-18599. URL: PM:14982936
- [63] Molino, M.; Blanchard, N.; Belmonte, E.; Tarver, A. P.; Abrams, C.; Hoxie, J. A.; Cerletti, C. und Brass, L. F. (1995): Proteolysis of the human platelet and endothelial cell thrombin receptor by neutrophil-derived cathepsin G, *J.Biol.Chem.* 270 [19], Seite 11168-11175. URL: PM:7744748
- [64] Jacques, S. L. und Kuliopulos, A. (2003): Protease-activated receptor-4 uses dual prolines and an anionic retention motif for thrombin recognition and cleavage, *Biochem.J.* 376 [Pt 3], Seite 733-740. URL: PM:13678420
- [65] Renesto, P.; Si-Tahar, M.; Moniatte, M.; Balloy, V.; Van Dorsselaer, A.; Pidard, D. und Chignard, M. (1997): Specific inhibition of thrombin-induced cell activation by the neutrophil proteinases elastase, cathepsin G, and proteinase 3: evidence for distinct cleavage sites within the aminoterminal domain of the thrombin receptor, *Blood.* 89 [6], Seite 1944-1953.
- [66] Blackhart, B. D.; Ruslim-Litrus, L.; Lu, C. C.; Alves, V. L.; Teng, W.; Scarborough, R. M.; Reynolds, E. E. und Oksenberg, D. (2000): Extracellular mutations of protease-activated receptor-1 result in differential activation by thrombin and thrombin receptor agonist peptide, *Mol.Pharmacol.* 58 [6], Seite 1178-1187. URL: PM:11093752
- [67] Vouret-Craviari, V.; Boquet, P.; Pouyssegur, J. und Obberghen-Schilling, E. (1998): Regulation of the actin cytoskeleton by thrombin in human endothelial cells: role of Rho proteins in endothelial barrier function, *Mol.Biol.Cell* 9 [9], Seite 2639-2653. URL: PM:9725917
- [68] Taylor, S. J.; Chae, H. Z.; Rhee, S. G. und Exton, J. H. (1991): Activation of the beta 1 isozyme of phospholipase C by alpha subunits of the Gq class of G proteins, *Nature* 350 [6318], Seite 516-518. URL: PM:1707501
- [69] Katada, T.; Bokoch, G. M.; Smigel, M. D.; Ui, M. und Gilman, A. G. (1984): The inhibitory guanine nucleotide-binding regulatory component of adenylate cyclase. Subunit dissociation and the inhibition of adenylate cyclase in S49 lymphoma cyc- and wild type membranes, *J.Biol.Chem.* 259 [6], Seite 3586-3595. URL: PM:6142891
- [70] Levitzki, A. und Bar-Sinai, A. (1991): The regulation of adenylyl cyclase by receptor-operated G proteins, *Pharmacol.Ther.* 50 [3], Seite 271-283. URL: PM:1754602
- [71] Nystedt, S.; Larsson, A. K.; Aberg, H. und Sundelin, J. (1995): The mouse proteinase-activated receptor-2 cDNA and gene. Molecular cloning and functional expression, *J.Biol.Chem.* 270 [11], Seite 5950-5955. URL: PM:7890726

- [72] Sabri, A.; Muske, G.; Zhang, H.; Pak, E.; Darrow, A.; Andrade-Gordon, P. und Steinberg, S. F. (2000): Signaling properties and functions of two distinct cardiomyocyte protease-activated receptors, *Circ.Res.* 86 [10], Seite 1054-1061. URL: PM:10827135
- [73] Schultheiss, M.; Neumcke, B. und Richter, H. P. (1997): Endogenous trypsin receptors in *Xenopus* oocytes: linkage to internal calcium stores, *Cell Mol.Life Sci.* 53 [10], Seite 842-849. URL: PM:9413553
- [74] Yu, R. und Hinkle, P. M. (1997): Desensitization of thyrotropin-releasing hormone receptor-mediated responses involves multiple steps, *J.Biol.Chem.* 272 [45], Seite 28301-28307. URL: PM:9353285
- [75] Macfarlane, S. R.; Seatter, M. J.; Kanke, T.; Hunter, G. D. und Plevin, R. (2001): Proteinase-activated receptors, *Pharmacol.Rev.* 53 [2], Seite 245-282. URL: PM:11356985
- [76] Kahn, M. L.; Nakanishi-Matsui, M.; Shapiro, M. J.; Ishihara, H. und Coughlin, S. R. (1999): Protease-activated receptors 1 and 4 mediate activation of human platelets by thrombin, *J.Clin.Invest* 103 [6], Seite 879-887. URL: PM:10079109
- [77] Brass, L. F.; Manning, D. R.; Cichowski, K. und Abrams, C. S. (1997): Signaling through G proteins in platelets: to the integrins and beyond, *Thromb.Haemost.* 78 [1], Seite 581-589. URL: PM:9198220
- [78] Hamberg, M.; Svensson, J. und Samuelsson, B. (1975): Thromboxanes: a new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 72 [8], Seite 2994-2998. URL: PM:1059088
- [79] Stenberg, P. E.; McEver, R. P.; Shuman, M. A.; Jacques, Y. V. und Bainton, D. F. (1985): A platelet alpha-granule membrane protein (GMP-140) is expressed on the plasma membrane after activation, *J.Cell Biol.* 101 [3], Seite 880-886. URL: PM:2411738
- [80] Hughes, P. E. und Pfaff, M. (1998): Integrin affinity modulation, *Trends Cell Biol.* 8 [9], Seite 359-364. URL: PM:9728397
- [81] Sims, P. J.; Wiedmer, T.; Esmon, C. T.; Weiss, H. J. und Shattil, S. J. (1989): Assembly of the platelet prothrombinase complex is linked to vesiculation of the platelet plasma membrane. Studies in Scott syndrome: an isolated defect in platelet procoagulant activity, *J.Biol.Chem.* 264 [29], Seite 17049-17057. URL: PM:2793843
- [82] Coughlin, S. R. (2001): Protease-activated receptors in vascular biology, *Thromb.Haemost.* 86 [1], Seite 298-307. URL: PM:11487018
- [83] Lum, H. und Malik, A. B. (1994): Regulation of vascular endothelial barrier function, *Am.J.Physiol* 267 [3 Pt 1], Seite L223-L241. URL: PM:7943249
- [84] Cirino, G.; Cicala, C.; Bucci, M. R.; Sorrentino, L.; Maraganore, J. M. und Stone, S. R. (1996): Thrombin functions as an inflammatory mediator through activation of its receptor, *J.Exp.Med.* 183 [3], Seite 821-827. URL: PM:8642286
- [85] Mirza, H.; Yatsula, V. und Bahou, W. F. (1996): The proteinase activated receptor-2 (PAR-2) mediates mitogenic responses in human vascular endothelial cells, *J.Clin.Invest* 97 [7], Seite 1705-1714. URL: PM:8601636

- [86] Alm, A. K.; Norstrom, E.; Sundelin, J. und Nystedt, S. (1999): Stimulation of proteinase activated receptor-2 causes endothelial cells to promote blood coagulation in vitro, *Thromb.Haemost.* 81 [6], Seite 984-988. URL: PM:10404779
- [87] Jerius, H.; Beall, A.; Woodrum, D.; Epstein, A. und Brophy, C. (1998): Thrombin-induced vasospasm: cellular signaling mechanisms, *Surgery* 123 [1], Seite 46-50. URL: PM:9457222
- [88] Vergnolle, N.; Hollenberg, M. D. und Wallace, J. L. (1999): Pro- and anti-inflammatory actions of thrombin: a distinct role for proteinase-activated receptor-1 (PAR1), *Br.J.Pharmacol.* 126 [5], Seite 1262-1268. URL: PM:10205017
- [89] Vergnolle, N.; Hollenberg, M. D.; Sharkey, K. A. und Wallace, J. L. (1999): Characterization of the inflammatory response to proteinase-activated receptor-2 (PAR2)-activating peptides in the rat paw, *Br.J.Pharmacol.* 127 [5], Seite 1083-1090. URL: PM:10455252
- [90] Naldini, A. und Carney, D. H. (1996): Thrombin modulation of natural killer activity in human peripheral lymphocytes, *Cell Immunol.* 172 [1], Seite 35-42.
- [91] Naldini, A.; Sower, L.; Bocci, V.; Meyers, B. und Carney, D. H. (1998): Thrombin receptor expression and responsiveness of human monocytic cells to thrombin is linked to interferon-induced cellular differentiation, *J.Cell Physiol.* 177 [1], Seite 76-84.
- [92] Schaffner, A.; Rhyn, P.; Schoedon, G. und Schaer, D. J. (2005): Regulated expression of platelet factor 4 in human monocytes--role of PARs as a quantitatively important monocyte activation pathway, *J.Leukoc.Biol.* 78 [1], Seite 202-209.
- [93] Corvera, C. U.; Dery, O.; McConalogue, K.; Gamp, P.; Thoma, M.; Al Ani, B.; Caughey, G. H.; Hollenberg, M. D. und Bunnett, N. W. (1999): Thrombin and mast cell tryptase regulate guinea-pig myenteric neurons through proteinase-activated receptors-1 and -2, *J.Physiol* 517 (Pt 3), Seite 741-756. URL: PM:10358115
- [94] Steinhoff, M.; Vergnolle, N.; Young, S. H.; Tognetto, M.; Amadesi, S.; Ennes, H. S.; Trevisani, M.; Hollenberg, M. D.; Wallace, J. L.; Caughey, G. H.; Mitchell, S. E.; Williams, L. M.; Geppetti, P.; Mayer, E. A. und Bunnett, N. W. (2000): Agonists of proteinase-activated receptor 2 induce inflammation by a neurogenic mechanism, *Nat.Med.* 6 [2], Seite 151-158. URL: PM:10655102
- [95] Yanagisawa, M.; Kurihara, H.; Kimura, S.; Tomobe, Y.; Kobayashi, M.; Mitsui, Y.; Yazaki, Y.; Goto, K. und Masaki, T. (1988): A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells, *Nature* 332 [6163], Seite 411-415. URL: PM:2451132
- [96] Inoue, A.; Yanagisawa, M.; Kimura, S.; Kasuya, Y.; Miyauchi, T.; Goto, K. und Masaki, T. (1989): The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 86 [8], Seite 2863-2867. URL: PM:2649896
- [97] Schmidt, M.; Kroger, B.; Jacob, E.; Seulberger, H.; Subkowski, T.; Otter, R.; Meyer, T.; Schmalzing, G. und Hillen, H. (1994): Molecular characterization of human and bovine endothelin converting enzyme (ECE-1), *FEBS Lett.* 356 [2-3], Seite 238-243. URL: PM:7805846

- [98] Douglas, S. A. und Ohlstein, E. H. (1997): Signal transduction mechanisms mediating the vascular actions of endothelin, *J.Vasc.Res.* 34 [3], Seite 152-164. URL: PM:9226297
- [99] Arai, H.; Hori, S.; Aramori, I.; Ohkubo, H. und Nakanishi, S. (1990): Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor, *Nature* 348 [6303], Seite 730-732. URL: PM:2175396
- [100] Sakurai, T.; Yanagisawa, M.; Takuwa, Y.; Miyazaki, H.; Kimura, S.; Goto, K. und Masaki, T. (1990): Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor, *Nature* 348 [6303], Seite 732-735. URL: PM:2175397
- [101] Masaki, T.; Miwa, S.; Sawamura, T.; Ninomiya, H. und Okamoto, Y. (1999): Subcellular mechanisms of endothelin action in vascular system, *Eur.J.Pharmacol.* 375 [1-3], Seite 133-138. URL: PM:10443571
- [102] Rubanyi, G. M. und Polokoff, M. A. (1994): Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology, *Pharmacol.Rev.* 46 [3], Seite 325-415. URL: PM:7831383
- [103] Sakamoto, A.; Yanagisawa, M.; Sawamura, T.; Enoki, T.; Ohtani, T.; Sakurai, T.; Nakao, K.; Toyo-oka, T. und Masaki, T. (1993): Distinct subdomains of human endothelin receptors determine their selectivity to endothelinA-selective antagonist and endothelinB-selective agonists, *J.Biol.Chem.* 268 [12], Seite 8547-8553. URL: PM:8473300
- [104] Orry, A. J. und Wallace, B. A. (2000): Modeling and docking the endothelin G-protein-coupled receptor, *Biophys.J.* 79 [6], Seite 3083-3094. URL: PM:11106614
- [105] Takigawa, M.; Sakurai, T.; Kasuya, Y.; Abe, Y.; Masaki, T. und Goto, K. (1995): Molecular identification of guanine-nucleotide-binding regulatory proteins which couple to endothelin receptors, *Eur.J.Biochem.* 228 [1], Seite 102-108. URL: PM:7882989
- [106] Sugden, P. H. und Clerk, A. (2005): Endothelin signalling in the cardiac myocyte and its pathophysiological relevance, *Curr.Vasc.Pharmacol.* 3 [4], Seite 343-351. URL: PM:16248777
- [107] Arai, K.; Maruyama, Y.; Nishida, M.; Tanabe, S.; Takagahara, S.; Kozasa, T.; Mori, Y.; Nagao, T. und Kurose, H. (2003): Differential requirement of G alpha12, G alpha13, G alphaq, and G beta gamma for endothelin-1-induced c-Jun NH2-terminal kinase and extracellular signal-regulated kinase activation, *Mol.Pharmacol.* 63 [3], Seite 478-488. URL: PM:12606754
- [108] Trevisi, L.; Bova, S.; Cargnelli, G.; Ceolotto, G. und Luciani, S. (2002): Endothelin-1-induced arachidonic acid release by cytosolic phospholipase A2 activation in rat vascular smooth muscle via extracellular signal-regulated kinases pathway, *Biochem.Pharmacol.* 64 [3], Seite 425-431. URL: PM:12147293
- [109] Wu-Wong, J. R.; Dayton, B. D. und Opgenorth, T. J. (1996): Endothelin-1-evoked arachidonic acid release: a Ca(2+)-dependent pathway, *Am.J.Physiol* 271 [3 Pt 1], Seite C869-C877. URL: PM:8843717

- [110] Curtis, T. M. und Scholfield, C. N. (2000): Transient Ca^{2+} -activated Cl^- -currents with endothelin in isolated arteriolar smooth muscle cells of the choroid, *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 41 [8], Seite 2279-2285. URL: PM:10892874
- [111] Masaki, T. (1995): Possible role of endothelin in endothelial regulation of vascular tone, *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 35, Seite 235-255. URL: PM:7598493
- [112] Iwamuro, Y.; Miwa, S.; Zhang, X. F.; Minowa, T.; Enoki, T.; Okamoto, Y.; Hasegawa, H.; Furutani, H.; Okazawa, M.; Ishikawa, M.; Hashimoto, N. und Masaki, T. (1999): Activation of three types of voltage-independent Ca^{2+} channel in A7r5 cells by endothelin-1 as revealed by a novel Ca^{2+} channel blocker LOE 908, *Br.J.Pharmacol.* 126 [5], Seite 1107-1114. URL: PM:10204997
- [113] Zhang, X. F.; Iwamuro, Y.; Enoki, T.; Okazawa, M.; Lee, K.; Komuro, T.; Minowa, T.; Okamoto, Y.; Hasegawa, H.; Furutani, H.; Miwa, S. und Masaki, T. (1999): Pharmacological characterization of Ca^{2+} entry channels in endothelin-1-induced contraction of rat aorta using LOE 908 and SK&F 96365, *Br.J.Pharmacol.* 127 [6], Seite 1388-1398. URL: PM:10455288
- [114] Minowa, T.; Miwa, S.; Kobayashi, S.; Enoki, T.; Zhang, X. F.; Komuro, T.; Iwamuro, Y. und Masaki, T. (1997): Inhibitory effect of nitrovasodilators and cyclic GMP on ET-1-activated Ca^{2+} -permeable nonselective cation channel in rat aortic smooth muscle cells, *Br.J.Pharmacol.* 120 [8], Seite 1536-1544. URL: PM:9113376
- [115] Jagroop, I. A.; Daskalopoulou, S. S. und Mikhailidis, D. P. (2005): Endothelin-1 and human platelets, *Curr.Vasc.Pharmacol.* 3 [4], Seite 393-399.
- [116] Malendowicz, L. K.; Brelinska, R.; De Caro, R.; Trejer, M. und Nussdorfer, G. G. (1998): Endothelin-1, acting via the A receptor subtype, stimulates thymocyte proliferation in the rat, *Life Sci.* 62 [21], Seite 1959-1963.
- [117] Sampaio, A. L.; Rae, G. A. und Henriques, M. M. (2000): Role of endothelins on lymphocyte accumulation in allergic pleurisy, *J.Leukoc.Biol.* 67 [2], Seite 189-195.
- [118] Guruli, G.; Pflug, B. R.; Pecher, S.; Makarenkova, V.; Shurin, M. R. und Nelson, J. B. (2004): Function and survival of dendritic cells depend on endothelin-1 and endothelin receptor autocrine loops, *Blood.* 104 [7], Seite 2107-2115.
- [119] Miyauchi, T. und Masaki, T. (1999): Pathophysiology of endothelin in the cardiovascular system, *Annu.Rev.Physiol* 61, Seite 391-415. URL: PM:10099694
- [120] Sakai, S.; Miyauchi, T.; Kobayashi, M.; Yamaguchi, I.; Goto, K. und Sugishita, Y. (1996): Inhibition of myocardial endothelin pathway improves long-term survival in heart failure, *Nature* 384 [6607], Seite 353-355. URL: PM:8934519
- [121] Bousette, N. und Giaid, A. (2003): Endothelin-1 in atherosclerosis and other vasculopathies, *Can.J.Physiol Pharmacol.* 81 [6], Seite 578-587. URL: PM:12839269
- [122] Seiler, S. M.; Peluso, M.; Tuttle, J. G.; Pryor, K.; Klimas, C.; Matsueda, G. R. und Bernatowicz, M. S. (1996): Thrombin receptor activation by thrombin and receptor-derived peptides in platelet and CHRF-288 cell membranes: receptor-stimulated GTPase and evaluation of agonists and partial agonists, *Mol.Pharmacol.* 49 [1], Seite 190-197.
- [123] Rasmussen, U. B.; Gachet, C.; Schlesinger, Y.; Hanau, D.; Ohlmann, P.; Obberghen-Schilling, E.; Pouyssegur, J.; Cazenave, J. P. und Pavirani, A. (1993): A

- peptide ligand of the human thrombin receptor antagonizes alpha-thrombin and partially activates platelets, *J.Biol.Chem.* 268 [19], Seite 14322-14328.
- [124] Lehmberg, J.; Putz, C.; Furst, M.; Beck, J.; Baethmann, A. und Uhl, E. (2003): Impact of the endothelin-A receptor antagonist BQ 610 on microcirculation in global cerebral ischemia and reperfusion, *Brain Res.* 961 [2], Seite 277-286.
- [125] Wallukat, G.; Morwinski, R.; Nissen, E.; Müller, J. und Luft, F. C. (2003): Effects of the tryptase receptor activating peptide and antibodies against the tryptase receptor PAR-2 on neonatal rat cardiomyocytes in culture, Matsumori, A, *Cardiomyopathies and heart failure: Biomolecular, infectious and immune mechanisms*, Seite 173-184, Kluwer Academic Publishers, Boston, ISBN: 1-4020-7438-7.
- [126] Albrecht, S.; Luther, T.; Grossmann, H.; Flössel, C.; Kotzsch, M. und Müller, M. (1992): An ELISA for tissue factor using monoclonal antibodies, *Blood Coagul.Fibrinolysis.* 3 [3], Seite 263-270.
- [127] Wollenberger, A. (1985): Isolated heart cells as a model of the myocardium, *Basic Res.Cardiol.* 80 Suppl 2:9-13., Seite 9-13.
- [128] Kolde, H.-J. (2001): *Haemostasis*, Pentapharm Ltd., Basel.
- [129] Auron, P. E. (1998): The interleukin 1 receptor: ligand interactions and signal transduction, *Cytokine Growth Factor Rev.* 9 [3-4], Seite 221-237.
- [130] Kereveur, A.; Enjyoji, K.; Masuda, K.; Yutani, C. und Kato, H. (2001): Production of tissue factor pathway inhibitor in cardiomyocytes and its upregulation by interleukin-1, *Thromb.Haemost.* 86 [5], Seite 1314-1319.
- [131] Shindo, T.; Ikeda, U.; Ohkawa, F.; Kawahara, Y.; Yokoyama, M. und Shimada, K. (1995): Nitric oxide synthesis in cardiac myocytes and fibroblasts by inflammatory cytokines, *Cardiovasc.Res.* 29 [6], Seite 813-819.
- [132] Banchereau, J. und Galizzi, J. P. (1990): Receptors for interleukin 4, interleukin 5 and interleukin 6, *Ann.Ist.Super.Sanita.* 26 [3-4], Seite 453-467.
- [133] Saito, M.; Yoshida, K.; Hibi, M.; Taga, T. und Kishimoto, T. (1992): Molecular cloning of a murine IL-6 receptor-associated signal transducer, gp130, and its regulated expression in vivo, *J.Immunol.* 148 [12], Seite 4066-4071.
- [134] Villegas, S.; Villarreal, F. J. und Dillmann, W. H. (2000): Leukemia Inhibitory Factor and Interleukin-6 downregulate sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase (SERCA2) in cardiac myocytes, *Basic Res.Cardiol.* 95 [1], Seite 47-54.
- [135] Tanaka, T.; Kanda, T.; Takahashi, T.; Saegusa, S.; Moriya, J. und Kurabayashi, M. (2004): Interleukin-6-induced reciprocal expression of SERCA and natriuretic peptides mRNA in cultured rat ventricular myocytes, *J.Int.Med.Res.* 32 [1], Seite 57-61.
- [136] Smart, N.; Mojet, M. H.; Latchman, D. S.; Marber, M. S.; Duchon, M. R. und Heads, R. J. (2006): IL-6 induces PI 3-kinase and nitric oxide-dependent protection and preserves mitochondrial function in cardiomyocytes, *Cardiovasc.Res.* 69 [1], Seite 164-177.

- [137] Palsson-McDermott, E. M. und O'Neill, L. A. (2004): Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4, *Immunology*. 113 [2], Seite 153-162.
- [138] Tavener, S. A. und Kubes, P. (2005): Is there a role for cardiomyocyte toll-like receptor 4 in endotoxemia?, *Trends Cardiovasc.Med.* 15 [5], Seite 153-157.
- [139] Calabro, P.; Willerson, J. T. und Yeh, E. T. (2003): Inflammatory cytokines stimulated C-reactive protein production by human coronary artery smooth muscle cells, *Circulation*. 108 [16], Seite 1930-1932.
- [140] Klouche, M.; Bhakdi, S.; Hemmes, M. und Rose-John, S. (1999): Novel path to activation of vascular smooth muscle cells: up-regulation of gp130 creates an autocrine activation loop by IL-6 and its soluble receptor, *J.Immunol.* 163 [8], Seite 4583-4589.
- [141] Kaur, J.; Dhaunsi, G. S. und Turner, R. B. (2004): Interleukin-1 and nitric oxide increase NADPH oxidase activity in human coronary artery smooth muscle cells, *Med.Princ.Pract.* 13 [1], Seite 26-29.
- [142] Beaumont, D. O.; Whitten, K. W.; Mock, R. G. und Slattery, C. W. (1989): Measuring platelet function with platelet shape change, an early event in aggregation, *Thromb.Res.* 53 [2], Seite 109-127.
- [143] Frishman, W. H.; Huberfeld, S.; Okin, S.; Wang, Y. H.; Kumar, A. und Shareef, B. (1995): Serotonin and serotonin antagonism in cardiovascular and non-cardiovascular disease, *J.Clin.Pharmacol.* 35 [6], Seite 541-572.
- [144] Dorsam, R. T.; Kim, S.; Jin, J. und Kunapuli, S. P. (2002): Coordinated signaling through both G12/13 and G(i) pathways is sufficient to activate GPIIb/IIIa in human platelets, *J.Biol.Chem.* 277 [49], Seite 47588-47595.
- [145] Barradas, M. A. und Mikhailidis, D. P. (1992): Serotonin, histamine and platelets in vascular disease with special reference to peripheral vascular disease, *Braz.J.Med.Biol.Res.* 25 [11], Seite 1063-1076.
- [146] Luscher, T. F. (1993): Platelet-vessel wall interaction: role of nitric oxide, prostaglandins and endothelins, *Baillieres Clin.Haematol.* 6 [3], Seite 609-627.
- [147] Tarpey, M. M.; White, C. R.; Suarez, E.; Richardson, G.; Radi, R. und Freeman, B. A. (1999): Chemiluminescent detection of oxidants in vascular tissue. Lucigenin but not coelenterazine enhances superoxide formation, *Circ.Res.* 84 [10], Seite 1203-1211.
- [148] Janiszewski, M.; Souza, H. P.; Liu, X.; Pedro, M. A.; Zweier, J. L. und Laurindo, F. R. (2002): Overestimation of NADH-driven vascular oxidase activity due to lucigenin artifacts, *Free Radic.Biol.Med.* 32 [5], Seite 446-453.
- [149] Liochev, S. I. und Fridovich, I. (1998): Lucigenin as mediator of superoxide production: revisited, *Free Radic.Biol.Med.* 25 [8], Seite 926-928.
- [150] Skatchkov, M. P.; Sperling, D.; Hink, U.; Mulsch, A.; Harrison, D. G.; Sindermann, I.; Meinertz, T. und Munzel, T. (1999): Validation of lucigenin as a chemiluminescent probe to monitor vascular superoxide as well as basal vascular nitric oxide production, *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 254 [2], Seite 319-324.

Literaturverzeichnis

- [151] Dörffel, Y.; Lätsch, C.; Stuhlmüller, B.; Schreiber, S.; Scholze, S.; Burmester, G. R. und Scholze, J. (1999): Preactivated peripheral blood monocytes in patients with essential hypertension, *Hypertension*. 34 [1], Seite 113-117.
- [152] Dörffel, Y.; Franz, S.; Pruss, A.; Neumann, G.; Rohde, W.; Burmester, G. R. und Scholze, J. (2001): Preactivated monocytes from hypertensive patients as a factor for atherosclerosis?, *Atherosclerosis*. 157 [1], Seite 151-160.
- [153] King, J. M.; Srivastava, K. D.; Stefano, G. B.; Bilfinger, T. V.; Bahou, W. F. und Magazine, H. I. (1997): Human monocyte adhesion is modulated by endothelin B receptor-coupled nitric oxide release, *J.Immunol*. 158 [2], Seite 880-886.
- [154] Browatzki, M.; Pfeiffer, C. A.; Schmidt, J. und Kranzhofer, R. (2005): Endothelin-1 induces CD40 but not IL-6 in human monocytes via the proinflammatory transcription factor NF-kappaB, *Eur.J.Med.Res.* %20;10 [5], Seite 197-201.

Anhang

D-PBS

NaCl	136,9 mM	8,00 g/l
KCl	2,7 mM	0,20 g/l
Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	8,1 mM	1,43 g/l
KH ₂ PO ₄	1,5 mM	0,20 g/l

Blotting-Puffer

Tris Base	25 mM	3,03 g/l
Glycin	200 mM	15,01 g/l
Methanol	4,93 M	200 ml/l

pH 8,5

Elektrophoresepuffer

Tris Base	25,0 mM	3,03 g/l
Glycin	191,9 mM	14,40 g/l
SDS	3,5 mM	1,00 g/l

pH 8,3

FACS-Puffer

D-PBS		
FCS		100 ml/l
NaN ₃	0,1 %	1 g/l

Lysispuffer

Tris Base	20 mM	2,42 g/l
NaCl	150 mM	8,77 g/l
EDTA	1 mM	0,29 g/l
EGTA	1 mM	0,38 g/l
Triton-X-100		10 ml/l
Natrium-pyrophosphat · 10H ₂ O	2,5 mM	1,12 g/l
Natrium-β-glycerolphosphat · 5H ₂ O	1 mM	0,31 g/l
Na ₃ VO ₄	1 mM	0,18 g/l
Leupeptin	2,10 μM	1 mg/l
Aprotinin	0,25 μM	2 mg/l
PMSF	1 mM	0,17 g/l

pH 7,5

Die Aktivierung von Natriumorthovanadat (Na₃VO₄) erfolgt mit einer 200 mM Lösung. Mit 1 N NaOH bzw. 1 N HCl wird der pH 10,0 eingestellt. Die Lösung ist gelb. Nun wird diese Lösung gekocht bis sie farblos ist. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird erneut der pH 10,0 eingestellt und die Lösung wird wieder gekocht. Diese Prozedur wird so lange wiederholt, bis die Lösung farblos bleibt und der pH 10,0 stabilisiert ist. Die aktivierte Natriumorthovanadat-Lösung wird aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt.

Anhang

PBS-Dialysepuffer

Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	7,8 mM	1,39 g/l
NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	2,2 mM	0,34 g/l
NaCl	154,0 mM	9,00 g/l

pH 7,2

PBS für Kardiomyozyten-Präparation

NaCl	120 mM	7,00 g/l
KCl	4,6 mM	0,34 g/l
KH ₂ PO ₄	440 µM	0,06 g/l
Na ₂ HPO ₄	420 µM	0,06 g/l
NaHCO ₃	25 mM	2,10 g/l
Glucose	5,5 mM	1,00 g/l
Streptomycin		0,10 g/l
Penicillin	100.000 IE/l	

pH 7,5

RPMI-1640

Anorganische Salze		
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	0,42 mM	100 mg/l
KCl	5,37 mM	400 mg/l
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,41 mM	100 mg/l
NaCl	102,67 mM	6 g/l
NaHCO ₃	23,81 mM	2 g/l
Na ₂ HPO ₄	5,64 mM	800 mg/l
Aminosäuren		
L-Arginin-HCl	1,14 mM	240 mg/l
L-Asparagin (freie Base)	0,38 mM	50 mg/l
L-Asparaginsäure	0,15 mM	20 mg/l
L-Cystin	0,21 mM	50 mg/l
L-Glutamin	2,00 mM	292,3 mg/l
L-Glutaminsäure	0,14 mM	20 mg/l
Glycin	0,13 mM	10 mg/l
L-Histidin (freie Base)	0,10 mM	15 mg/l
L-Hydroxyprolin	0,15 mM	20 mg/l
L-Isoleucin	0,38 mM	50 mg/l
L-Leucin	0,38 mM	50 mg/l
L-Lysin-HCl	0,22 mM	40 mg/l
L-Methionin	0,10 mM	15 mg/l
L-Phenylalanin	0,09 mM	15 mg/l
L-Prolin	0,17 mM	20 mg/l
L-Serin	0,29 mM	30 mg/l
L-Threonin	0,17 mM	20 mg/l
L-Tryptophan	0,02 mM	5 mg/l
L-Tyrosin	0,11 mM	20 mg/l
L-Valin	0,17 mM	20 mg/l
Vitamine		
D-Biotin	0,82 µM	0,2 mg/l
D-Calcium-pantothenat	1,05 µM	0,25 mg/l
Cholinchlorid	0,02 mM	3 mg/l
Folsäure	2,27 µM	1 mg/l
i-Inositol	0,19 mM	35 mg/l

Niacinamid (Nikotinamid)	8,19 μ M	1 mg/l
p-Aminobenzoesäure	7,29 μ M	1 mg/l
Pyridoxal·HCl	4,91 μ M	1 mg/l
Riboflavin	0,53 μ M	0,2 mg/l
Thiamin·HCl	2,96 μ M	1 mg/l
Vitamin B ₁₂	3,69 nM	5 μ g/l
Andere Komponenten		
FKS		100 ml/l
Gentamycin		50 mg/l
D-Glucose	11,10 mM	2 g/l
Glutathion (reduziert)	3,25 μ M	1 mg/l
Penicillin		10 ⁵ E/l

L-Glutamin wird als 200 mM-Aliquots bei –20°C gelagert und zu Abfüllungen von 50 ml Medium frisch hinzugegeben (1:100).

SDS-Polyacrylamid-Gel

	Trenngel	Sammelgel
Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1)	10 %	5 %
Tris Base	375 mM	125 mM
SDS	0,1 %	0,1 %
APS	0,1 %	0,1 %
TEMED	0,04 %	0,1 %
pH	8,8	6,8

SDS-Probenpuffer

Tris Base	62,5 mM	7,57 g/l
SDS	69,4 mM	20 g/l
Glycerol	1,37 M	100 ml/l
DTT	50,0 mM	7,72 g/l
Bromphenolblau	0,6 mM	0,1 g/l

pH 6,8 (eingestellt mit HCl)

SM20-I

Anorganische Salze		
CaCl ₂	1,263 mM	140 mg/l
KCl	4,96 mM	369,94 mg/l
KH ₂ PO ₄	441 μ M	60 mg/l
MgCl ₂ · 6H ₂ O	985 μ M	200 mg/l
NaCl	111,225 mM	6,5 g/l
NaHCO ₃	7,856 mM	660 mg/l
Na ₂ HPO ₄	419 μ M	59,5 mg/l
Aminosäuren		
L-Arginin·HCl	596 μ M	126 mg/l
L-Cystin	100,8 μ M	24 mg/l
L-Cystein·HCl	6 μ M	1 mg/l
L-Glutamin	960 μ M	140 mg/l
L-Histidin	5 mM	775 mg/l
L-Histidin·HCl	76 μ M	16 mg/l
L-Hydroxyprolin	38 μ M	5 mg/l
L-Isoleucin	344 μ M	45 mg/l
L-Leucin	640 μ M	84 mg/l
L-Lysin-2-HCl	402 μ M	88 mg/l
L-Methionin	161 μ M	24 mg/l

Anhang

L-Phenylalanin	260 µM	43 mg/l
L-Prolin	87 µM	10 mg/l
L-Serin	95 µM	10 mg/l
L-Threonin	405 µM	48 mg/l
L-Tryptophan	49 µM	10 mg/l
L-Tyrosin	200 µM	36 mg/l
L-Valin	580 µM	62 mg/l
Vitamine		
L-Ascorbinsäure	11,3 µM	2 mg/l
D-Biotin	4 µM	1 mg/l
D-Calcium-pantothenat	3 µM	1 mg/l
Cholinchlorid	6 µM	1 mg/l
Folsäure	2 µM	1 mg/l
meso-Inosit	5,5 µM	1 mg/l
Nicotinsäureamid	8 µM	1 mg/l
p-Aminobenzoesäure	7 µM	1 mg/l
Pyridoxin-HCl	5 µM	1 mg/l
Riboflavin	0,5 µM	0,2 mg/l
Thiamin-HCl	3 µM	1 mg/l
Andere Komponenten		
Adenosin	24 µM	7 mg/l
D-Glucose	11,1 mM	2 g/l
Hydrocortison	2 µM	1 mg/l
Hypoxanthin	9 µM	1,2 mg/l
Insulin		0,1 E/l
Penicillin-G		10 ³ E/l
Streptomycinsulfat		100 mg/l
Xanthin	5 µM	0,8 mg/l

pH 7,7-7,8

SmGM-2

SmBM
hEGF
hFGF
kein Dexamethason
GA-1000 (Gentamycin, Amphotericin-B)
FBS 5 %
Insulin

(Weitere Angaben fehlen in der Produktbeschreibung vom Hersteller.)

TBST

Tris Base	20 mM	2,42 g/l
NaCl	140 mM	8,18 g/l
Tween-20		1 ml/l

pH 7,6 (eingestellt mit HCl)

TV-Lösung

NaCl	136,89 mM	8,00 g/l
KCl	2,68 mM	0,20 g/l
Na ₂ HPO ₄	8,10 mM	1,15 g/l
KH ₂ PO ₄	1,47 mM	0,20 g/l

Phenolrot		0,01 g/l
Trypsin		1,25 g/l
EDTA 2H ₂ O	1,22 mM	0,40 g/l
Penicillin-G		10 ⁵ E/l
Streptomycinsulfat		100 mg/l

Tyrode-Puffer

NaCl	140,00 mM	8,18 g/l
KCl	2,68 mM	2,00 g/l
NaHCO ₃	11,90 mM	1,00 g/l
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	0,36 mM	0,05 g/l
MgCl ₂ · 6H ₂ O	4,00 mM	0,81 g/l
Glucose	5,56 mM	1,00 g/l
HEPES	5,00 mM	1,19 g/l
BSA		3,50 g/l

pH 7,35

Waschpuffer für Thrombozyten-Präparation

NaCl	100 mM	5,84 g/l
KCl	5 mM	0,37 g/l
MgCl ₂ · 6H ₂ O	2 mM	0,41 g/l
CaCl ₂ · 2H ₂ O	2 mM	0,29 g/l
Zitronensäure · H ₂ O	36 mM	7,56 g/l
Glucose	5 mM	0,90 g/l
BSA		3,50 g/l

pH 6,5

Eidesstattliche Erklärung

Die vorliegende Arbeit wurde von mir eigenständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel durchgeführt.

Ich besitze keinen Doktorgrad und habe mich bisher nicht anderweitig um einen entsprechenden Titel beworben.

Ich habe die gültige Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Humboldt-Universität Berlin zur Kenntnis genommen.

Jeannette Freier

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Jeannette Freier
Geburtsdatum	10.05.1978
Geburtsort	Frankfurt/Oder

Schule

06/1997	Abitur am Gymnasium Beeskow, Brandenburg, Note 1,2
---------	--

Studium

10/1997 – 01/2003	Studiengang Humanbiologie an der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald
	Abschluss Diplom, Note 1,6
	Thema der Diplomarbeit: „Einfluss von Liganden auf die Adhäsion und Aktivierung von Thrombozyten unter statischen und dynamischen Bedingungen“

Promotion

02/2003 – 06/2007	Promotionsarbeit in der Arbeitsgruppe „Immunologie kardiovaskulärer Erkrankungen“ unter der Leitung von Dr. G. Wallukat am Max-Delbrück-Zentrum für Molekulare Medizin in Berlin
-------------------	--

Danksagung

Betreuer meiner Promotionsarbeit war Herr Dr. Wallukat, Leiter der Arbeitsgruppe „Immunologie kardiovaskulärer Erkrankungen“ am Max-Delbrück-Zentrum für Molekulare Medizin in Berlin. Ihm gilt mein besonderer Dank. Herr Dr. Wallukat bot mir diese interessante Arbeit an und gab mir viele wertvolle Anregungen. Ich danke ihm für seine Hilfe, seine permanente Diskussionsbereitschaft und für die Fülle an Erläuterungen und Hintergrundinformationen.

Seitens der Humboldt-Universität Berlin stellte sich Herr Prof. Uckert freundlicherweise zur Verfügung, meine Arbeit zu betreuen. Er ermöglichte mir überhaupt erst das Promotionsverfahren und half mir besonders bei den anfänglichen Startschwierigkeiten mit wertvollen Tipps. Herr Prof. Uckert ermöglichte mir außerdem die FACS-Messungen in seinem Labor.

Besonderen Dank richte ich an Frau Wegener, Frau Karczewski und Christian für ihre unermüdliche, tatkräftige Unterstützung im Labor. Ebenso danke ich Frau Dr. Bartel für die sorgfältige Aufbereitung und Verwaltung der Antikörper-Präparate und Herrn Dr. Schulze für die Anfertigung und Beurteilung immunfluoreszenz-mikroskopischer Präparate.

Herrn Dr. Radtke und Mitarbeiter(n)/-innen von der Blutspendeabteilung der Charité Berlin danke ich dafür, dass sie mir Blutproben zur Verfügung stellten für meine Versuche mit Thrombozyten. Für die Isolierung von Monozyten bekam ich Blut von Spendern des HAEMA Blutspendezentrums Marzahn. Hier danke ich besonders Frau Dr. Jaster und Mitarbeitern/Innen für ihre geduldige Unterstützung und aufmunternden Gespräche.

Außerdem bedanke ich mich bei Frau Dr. Englert und Frau Haake vom Deutschen Herzzentrum Berlin für ihre freundliche Mithilfe. Frau Küttner und Boris danke ich für die Einarbeitung am FACS-Gerät.

Des Weiteren richte ich ein großes Dankeschön an Katja, Dajana, Marion und Dana für ihre verständnisvollen Aufmunterungen und ihren Witz und Humor. Sie hatten immer ein Ohr für Kummer und Sorgen und schafften eine angenehme Arbeitsatmosphäre.

Meinen herzlichsten Dank richte ich an meine lieben Eltern, weil sie mir das Studium ermöglichten und ich auch sonst stets auf ihre Unterstützung bauen konnte.